

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της χημικής σύστασης ερυθρών οίνων κατά την οξειδωτική
τους ωρίμαση

Αθανάσιος Φ. Αθανασίου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Σταματίνα Καλλίθρακα

ΑΘΗΝΑ 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της χημικής σύστασης ερυθρών οίνων κατά την οξειδωτική
τους ωρίμαση

Αθανάσιος Φ. Αθανασίου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Σταματίνα Καλλίθρακα

ΑΘΗΝΑ 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Μελέτη της χημικής σύστασης ερυθρών οίνων κατά την οξειδωτική
τους ωρίμανση*

Αθανάσιος Φ. Αθανασίου

Εξεταστική Επιτροπή

Καλλίθρακα Στ., Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

Κοτσερίδης Γ., Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

Μπινιάρη Αικ., Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οινολογίας του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Αμπελουργία - Οινολογία», κάτω από την επίβλεψη της επίκουρου καθηγήτριας του τμήματος δρ. Καλλίθρακα Σταματίνας, την οποία και θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη, την υπομονή και την ανοχή που μου έδειξε, αλλά και για το φιλικό κλίμα που δημιούργησε βοηθώντας τους φοιτητές να λειτουργήσουν αποτελεσματικότερα. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του τμήματος κ. Κοτσερίδη Γεώργιο, για τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη διάρκεια του προγράμματος. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Ελένη Τζανακούλη, χωρίς τη βοήθεια και την υποστήριξη της οποίας η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής θα ήταν πάρα πολύ δύσκολη. Επίσης, ευχαριστώ την κ. Προξενιά Νίκη, τόσο για την πολύτιμη βοήθειά της και τις γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος. Ευχαριστώ επίσης την κ. Μπινιάρη Αικατερίνη και ως μέλος της επιτροπής, αλλά και για τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη διάρκεια του προγράμματος. Στις ευχαριστίες μου δεν θα μπορούσα να μην συμπεριλάβω τον συμφοιτητή μου, Δημήτρη Τζάκο για την βοήθεια του και τη γενικότερη συνεργασία μας τόσο εντός όσο και εκτός του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Τέλος, ευχαριστώ όλους όσους ενεπλάκησαν στην καθημερινότητά μου κατά τη διάρκεια του προγράμματος, καθηγητές, προσωπικό, συμφοιτητές και λοιπούς, αλλά και φίλους που απέκτησα και με στήριξαν με τον τρόπο τους καθ' όλη την πορεία των σπουδών μου.

Αθανάσιος Αθανασίου

Περίληψη

Στην παρούσα μεταπτυχιακή έρευνα μελετήθηκε η επίδραση της οξειδωτικής παλαίωσης οίνου ποικιλίας Syrah σε επιλεγμένες ποιοτικές του παραμέτρους. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά είδη βαρελιών (παλαιό γαλλικό βαρέλι, γαλλική δρυς, αμερικάνικη δρυς) και ένας μάρτυρας (δεξαμενή). Η προσοχή εστιάστηκε κυρίως στα φαινολικά συστατικά, τα οποία είναι υπεύθυνα για το χρώμα, και για αρκετά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Εφαρμόστηκαν διαφορετικές τεχνικές για κάθε δείγμα, με μικρές τροποποιήσεις σε σχέση με τον τρόπο που αναφέρονται στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, οι οποίες χρησιμοποιούνται αρκετά χρόνια σε έρευνες αυτού του αντικειμένου και έχει φανεί ότι δίνουν καλά αποτελέσματα. Επιπλέον, στο τελικό προϊόν ακολούθησε οργανοληπτικός έλεγχος με χρήση κλίμακας από μη εκπαιδευμένο πάνελ. Ο οίνος που παλαίωσε σε βαρέλι αμερικανικής δρυός παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές στον δείκτη HCl, στη συγκέντρωση συμπυκνωμένων ταννινών, στην αντιοξειδωτική ικανότητα, στον δείκτη ολικών φαινολών (Δ.Φ.Ο.), και στις ολικές ανθοκυάνες. Το δείγμα του παλαιού βαρελιού παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή έγχρωμων και ολικών ανθοκυανών, ενώ παράλληλα και η ένταση χρώματος είναι υψηλή. Το δείγμα που παρέμεινε στην δεξαμενή παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή επιμέρους ανθοκυανών, τη χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών, αλλά παράλληλα τη μεγαλύτερη ένταση χρώματος. Παράλληλα όμως παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή του δείκτη ιονισμού των ανθοκυανών μαζί με την αμερικανική δρυ γεγονός που εξηγεί την μεγάλη τιμή της έντασης του χρώματος. Όσον αφορά τον οργανοληπτικό έλεγχο, το πάνελ των δοκιμαστών έδειξε να προτιμά τον οίνο που παρέμεινε σε βαρέλι γαλλικής δρυός, καθώς υπερείχε στην εμφάνιση, το άρωμα, την γεύση και την επίγευση συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Επίσης φαίνεται να υπερέχουν οι οίνοι που παρέμειναν στο βαρέλι σε σχέση με τον μάρτυρα (δεξαμενή) δείχνοντας την θετική επίδραση του ξύλου στα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες του οίνου.

Λέξεις κλειδιά : Syrah, ερυθρός οίνος, δρυς, παλαίωση, φαινολικά, HPLC

Study of the chemical composition of red wines during their oxidative maturation

Abstract

The effect of oak barrel ageing on selected quality parameters of red wines from Syrah variety was studied in the current postgraduate dissertation. More specifically, three different oak wood barrels which included American, French and a previously used French oak barrel were used. Specific attention was paid mainly on phenolic compounds, since they are responsible for color, and other important organoleptic characteristics of the wine. Different techniques were implemented for each sample, with minor modifications regarding the way referred to in the existing literature, which have been used for several years in the research of this subject. Moreover, sensory analysis of the finished wines took place by an untrained panel. The sample of the American oak barrel resulted in the lowest values of HCl index, concentration of concentrated tannins, antioxidant activity and total anthocyanin concentration. The fact that the sample of American oak had the lowest index in HCl (34%) relative to the quite high values of the other samples indicates a wine with lower concentration of highly polymerized phenolic compounds. All the samples resulted in a high concentration of highly polymerized phenolic compounds (>25%). The sample of the used

French barrel exhibited the highest value of colored anthocyanins and total anthocyanins, while the color intensity was also high. The sample that remained in the tank was characterized by the lowest value of individual anthocyanins, and concentration of total anthocyanins, while color intensity was the highest. This might be explained by the ionization index value which was the highest measured in comparison with the relative values of the rest samples. Regarding the outcomes of sensory analysis, the sample which aged in French barrel received the highest average grade from the panel.

Key words : Syrah, red wine, oak, ageing, phenolics, HPLC

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	- 5 -
Abstract	- 5 -
Εισαγωγή.....	- 10 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	- 13 -
1.1 Χημεία των φαινολικών παραγώγων.....	- 15 -
1.2 Μη φλαβονοειδείς φαινόλες.....	- 17 -
1.2.1 Φλαβονοειδείς ενώσεις.....	- 19 -
1.2.2 Φλαβονόλες	- 19 -
1.3 Ταννίνες.....	- 20 -
1.3.1 Υδρολυόμενες ταννίνες	- 21 -
1.3.2 Προκυανιδίνες	- 22 -
1.3.3 Πολυμερισμός προκυανιδινών	- 23 -
1.3.4 Κατεχίνες και προκυανιδίνες στους οίνους.....	- 24 -
1.3.5 Αντιδράσεις των ταννινών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες.....	- 26 -
1.4 Ανθοκυάνες	- 27 -
1.4.1 Δομή και ιδιότητες των ανθοκυανών	- 29 -
1.4.2 Σύμπλοκα ανθοκυανών	- 31 -
1.5 Καθίζηση των έγχρωμων ενώσεων σε νέους οίνους.....	- 33 -
1.5.1 Το χρώμα των ερυθρών οίνων.....	- 33 -
1.5.2 Καθίζηση των έγχρωμων ενώσεων σε παλαιωμένους οίνους.....	- 34 -
1.6 Άλλες ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων	- 35 -
1.6.1 Οργανοληπτικές ιδιότητες στους ερυθρούς οίνους.....	- 35 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΠΑΛΑΙΩΣΗ	- 37 -
2.1 Αντιδράσεις κατά την παλαίωση σε βαρέλι και σε φιάλη.....	- 37 -
2.2 Η επίδραση του δρύινου βαρελιού στις φαινολικές ουσίες των οίνων	- 38 -
2.3 Μεταβολές στις ταννίνες που μαλακώνουν τον οίνο	- 38 -
2.4 Αρωματικά συστατικά κατά τη διάρκεια της παλαίωσης.....	- 40 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- ΞΥΛΟ	- 40 -
3.1 Βαθμός καψίματος.....	- 42 -
3.2 Υποπροϊόντα δρυός.....	- 43 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- Μέθοδοι προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων	- 44 -
4.1 Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού	- 44 -

4.2 Φάσματα απορροφήσεως υπεριώδους –ορατού	45 -
4.3 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός	45 -
4.4 Ολικές φαινόλες	45 -
4.5 Ολικές ανθοκυάνες.....	46 -
4.6 Ολικές Ταννίνες.....	47 -
4.7 Χαρακτηριστικά των ταννινών.....	47 -
4.8 Δείκτης υδροχλωρικού οξέος	47 -
4.9 Ένταση χρώματος και απόχρωση.....	48 -
4.10 Δείκτης Ιονισμού.....	48 -
4.11 Ανθοκυάνες με HPLC	49 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	49 -
5.1 Στόχος και σχεδιασμός πειράματος.....	49 -
5.2 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	50 -
5.2.1 Χαρακτηριστικά ποικιλιών που μελετήθηκαν.....	50 -
Η ποικιλία Syrah	50 -
5.2.2 Οργανοληπτική ανάλυση.....	52 -
5.2.3 Ένταση - απόχρωση	54 -
5.2.4 . Μέτρηση pH και ογκομετρούμενης οξύτητας.....	55 -
5.2.5 Αλκοολικός τίτλος.....	56 -
5.2.6 Ολικές ανθοκυάνες.....	60 -
5.2.7 Δείκτης ιονισμού	60 -
5.2.8 Δείκτης ολικών φαινολών (Δ.Φ.Ο.)	61 -
5.2.9 Ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	61 -
5.2.10 Ταννίνες με βρασμό (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες)	62 -
5.2.11 Δείκτης HCL (πολυμερισμένες ταννίνες –ικανότητα παλαίωσης).....	63 -
5.2.12 Χημική Εκτίμηση στυπτικότητας του οίνου με τη μέθοδο BSA.....	63 -
5.2.13 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose σε οίνους	65 -
5.2.14 Προσδιορισμός ανθοκυανών με HPLC	66 -
5.2.15 Εκτίμηση ελλαγικών ταννινών με HPLC	67 -
5.2.16 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – μέθοδος DPPH.....	68 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	69 -
6.1 Ένταση – Απόχρωση	70 -
6.2 Ολικές ανθοκυάνες.....	72 -
6.3 Δείκτης ιονισμού	74 -
6.4 Δείκτης ολικών φαινολών (Δ.Φ.Ο.)	76

6.5 Ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	77
6.6 Ταννίνες με βρασμό (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες)	78
6.7 Δείκτης HCl (πολυμερισμένες ταννίνες – ικανότητα παλαίωσης).....	79
6.8 Ταννίνες με τη μέθοδο BSA (δέσμευση από πρωτεΐνες – δείκτης στυπτικότητας)	80
6.9 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – μέθοδος DPPH.....	81
6.10 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose σε οίνους	82
6.11 Προσδιορισμός ελλαγικών ταννινών με HPLC.....	83
6.12 Προσδιορισμός ανθοκυανών με HPLC	84
6.13 Συσχέτιση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης ανθοκυανών	87
6.14 Οργανοληπτικός Έλεγχος.....	88
7 Συμπεράσματα.....	95
Βιβλιογραφία.....	97
Ελληνική βιβλιογραφία	105

Εισαγωγή

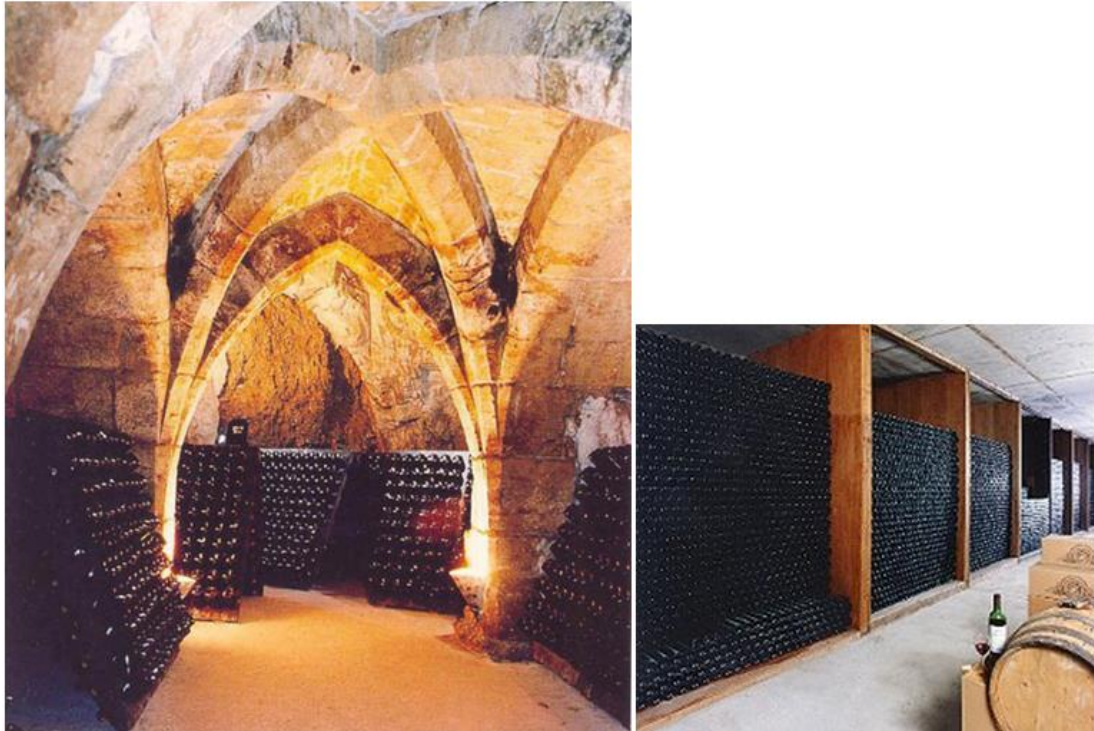
Η βελτίωση της ποιότητας του οίνου με την ωρίμαση του, τον διαχωρίζει από τα περισσότερα καταναλωτικά αγαθά. Ως γνωστόν, ο οίνος εξελίσσεται με το χρόνο. Περίπλοκες χημικές αντιδράσεις και ζυμώσεις που αφορούν τα σάκχαρα, τα οξέα και άλλα συστατικά όπως οι ταννίνες, επηρεάζουν το άρωμα, το χρώμα, την υφή και τη γεύση του. Κάποιες φορές με τέτοιο τρόπο ώστε όσο περνάει ο χρόνος να γίνεται πιο απολαυστικός σε αυτόν που τον δοκιμάζει. Η ποικιλία του σταφυλιού, η μέθοδος οινοποίησης και ο χρόνος εμφιάλωσης επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα ενός οίνου να βελτιώνεται με την ωρίμαση (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Ο απαιτούμενος χρόνος ωρίμασης, αλλά και ο χρόνος κατά τη διάρκεια του οποίου ο οίνος παραμένει ευχάριστος για κατανάλωση, δεν είναι σταθερός. Στην περίπτωση των ερυθρών οίνων, η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις και η οξύτητα έχουν άμεση σχέση με την διάρκεια ζωής του οίνου. Οι 'οίνοι παλαίωσης' ή 'οίνοι ωρίμασης' παράγονται μετά από μακρά εκχύλιση, καθώς χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε ταννίνες, τραχεία γεύση, και πλούσιο σώμα (Κοτσερίδης, 2005). Θα μπορούσαμε να πούμε ότι η ωρίμαση είναι το σύνολο των φαινομένων που μεταβάλλουν τα χαρακτηριστικά του οίνου – που προέρχονται από το σταφύλι και τις ζύμες – και δημιουργούν νέα, τα οποία συνήθως διαφέρουν από τα προηγούμενα. Η ωρίμαση και η παλαίωση είναι διαδικασίες που δεν εφαρμόζονται σε όλα τα κρασιά. Προκειμένου να ξεκαθαρίσουμε τους δύο αυτούς όρους, σημειώνουμε ότι **ωρίμαση** είναι η παραμονή του κρασιού σε δρύινα βαρέλια (ή ανοξείδωτα δοχεία) και περιλαμβάνει το σύνολο των διεργασιών που γίνονται εκεί. Ως **παλαίωση** εννοείται ο χρόνος που περνάει το κρασί στη φιάλη μέχρι να καταναλωθεί (Σουφλερός, 2012). Η βασική ειδοποιός διαφορά είναι ότι στη μεν ωρίμαση έχουμε συμμετοχή του οξυγόνου, στη δε παλαίωση όχι. Τα λευκά, τα ροζέ και τα ελαφρά ερυθρά κρασιά, συνήθως καταναλώνονται νωρίς, χωρίς να περάσουν από βαρέλι, προκειμένου να απολαύσουμε την φρεσκάδα των πρωτογενών αρωμάτων και της γεύσης της ποικιλίας. Το φαινόμενο αυτό δεν αφορά μόνον τα ελληνικά, αλλά την πλειονότητα των λευκών κρασιών και οφείλεται στο ότι τα λευκά κρασιά περιέχουν μικρότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων (ανθοκυάνες και ταννίνες), σε σχέση με τους ερυθρούς οίνους οι οποίες είναι κυρίως υπεύθυνες για τις βιοχημικές διαδικασίες της παλαίωσης. Αντίθετα ορισμένα λευκά κρασιά και τα περισσότερα ερυθρά απαιτούν παλαίωση προκειμένου να μειωθεί η πολύ η τονισμένη οξύτητα τους και να μαλακώσουν γευστικά οι επιθετικές ταννίνες τους αντίστοιχα. Κατά την παραμονή του κρασιού στο βαρέλι λαμβάνουν χώρα ένα σύνολο πολύπλοκων αντιδράσεων που αποτελούν την οξειδωτική ωρίμαση (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Από τους πόρους του βαρελιού επιτρέπεται η είσοδος μικρών ποσοτήτων οξυγόνου, το οποίο αντιδρά με τις ουσίες του οίνου με αποτέλεσμα ο οίνος να χάνει με την πάροδο του χρόνου τον άγριο και επιθετικό οργανοληπτικό του χαρακτήρα. Παράλληλα, από το βαρέλι μεταφέρονται στο κρασί ορισμένες ουσίες, οι οποίες εμπλουτίζουν την χημική του σύνθεση. Καθοριστικό σημείο για την ωρίμαση είναι η παραμονή του κρασιού στο βαρέλι. Οι πόροι του βαρελιού επιτρέπουν την είσοδο οξυγόνου ($2-5 \text{ cm}^3\text{O}_2/\text{L}/\text{έτος}$), το οποίο αντιδρά με αρκετά συστατικά του κρασιού δημιουργώντας το σύνολο των αντιδράσεων της λεγόμενης οξειδωτικής παλαίωσης (Σουφλερός, 2012). Ταυτοχρόνως το ξύλο και το κρασί αλληλεπιδρούν επίσης. Μπορούμε λοιπόν να πούμε σχηματικά ότι η ωρίμαση στο βαρέλι είναι τριπαραγοντική διαδικασία:

κρασί, βαρέλι, οξυγόνο. Στη διαμόρφωση του μπουκέτου της ωρίμασης, καθοριστικό ρόλο διαδραματίζουν οι αρωματικές ουσίες του ξύλου της δρυός, και ιδιαίτερα η βανιλίνη και είναι γνωστή μας από τη βανίλια. Η ουσία αυτή υπάρχει άφθονη κυρίως στα δρύινα βαρέλια (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Δρύινα Βαρέλια (Πηγή <http://www.moa.gov.cy>)

Επομένως, η δρυς (βελανιδιά) είναι αναντικατάστατη για την κατασκευή βαρελιών. Μέσα στο βαρέλι μεταβάλλεται η φαινολική σύσταση του οίνου, κυρίως με την δημιουργία συμπλόκων που έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενώσεων λιγότερο στυφών (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Ωστόσο αξίζει να τονιστεί ότι η παραμονή στο δρύινο βαρέλι δεν είναι υποχρεωτική για όλα τα κόκκινα κρασιά. Κατ' αρχήν ένα Nouveau δεν περνά εξ ορισμού από βαρέλι. Επίσης ορισμένα κόκκινα κρασιά με μικρή συγκέντρωση ταννινών, ίσως δεν θα ωφεληθούν από τη μακρόχρονη παραμονή σε βαρέλι. Σε πολλές περιπτώσεις, το διάστημα παραμονής στο βαρέλι καθορίζεται νομοθετικά σε ένα χρόνο (12 μήνες). Το βαρέλι, από την άλλη πλευρά, δεν μπορεί να προσφέρει θετικά στη διαδικασία της ωρίμασης που πραγματοποιείται στο εσωτερικό του, για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των τριών ετών. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο, στις περιπτώσεις υψηλής ποιότητας οίνων, χρησιμοποιούνται νέα βαρέλια, συντελώντας έτσι σε ουσιαστική αύξηση της τιμής του τελικού προϊόντος. Η παλαίωση του κρασιού συνεχίζεται και στη φιάλη, η οποία ονομάζεται αναγωγική (Εικόνα 2), αφού ο φελλός εξασφαλίζει την απουσία του οξυγόνου (Σουφλερός, 2012). Σε αυτή τη φάση, που διαρκεί από μήνες έως πολλά χρόνια, αναπτύσσεται το αναγωγικό μπουκέτο του κρασιού. Βεβαίως, οι διαδικασίες αυτές (οξειδωτική και αναγωγική παλαίωση), διέπονται από αρκετές νομοθετικές ρυθμίσεις. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη Νομοθεσία, κάθε οινοποιός ο οποίος προτίθεται να παλαιώσει Οίνο Ελεγχόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Ο.Ε.Ο.Π.), πρέπει να έχει εξασφαλίσει έγκριση του χώρου παλαίωσης από την αρμόδια Αρχή, η οποία είναι το Συμβούλιο Αμπελοοινικών Προϊόντων, να τηρεί βιβλία στα οποία να καταγράφει τον εξοπλισμό (φιάλες, βαρέλια, δεξαμενές), να καταγράφει τη θερμοκρασία και την υγρασία του χώρου παλαίωσης και να διατηρεί βιβλίο αποθήκης στο οποίο να καταχωρείται κάθε στοιχείο σχετικό με τους υπό παλαίωση οίνους. Φυσικά, και στις περιπτώσεις των υπόλοιπων οίνων, οι οποίοι φέρουν στη σήμανσή τους ενδείξεις παλαίωσης, οι οινοποιοί πρέπει να μπορούν να τεκμηριώνουν προς την αρμόδια Αρχή, τη διαδικασία της παλαίωσης.



Εικόνα 2. «Αναγωγική» Παλαίωση (Πηγή <http://www.athinorama.gr>)

Τρόποι παλαίωσης και συντήρησης

Ανάλογα με τους τύπους των οίνων, μπορούμε να διακρίνουμε δύο τρόπους παλαίωσης και συντήρησης, μεταξύ των οποίων υπάρχουν αρκετοί άλλοι ενδιάμεσοι τρόποι. Στην πρώτη περίπτωση, οι οίνοι οφείλουν την παλαίωση και τη βελτίωση τους σε φαινόμενα οξειδωσης. Πρόκειται για οίνους Rancio, Porto, Jerez, Madere, ορισμένους vins doux naturels και οίνους ενισχυμένους με αλκοόλη, οι οποίοι παρασκευάζονται κυρίως στις μεσογειακές περιοχές με θερμό κλίμα, μετά από μακρόχρονη παραμονή σε βαρέλια και εμπλουτισμό με αλκοόλη. Στη δεύτερη περίπτωση, οι οίνοι –αντίθετα με τους προηγούμενους– διατηρούνται πάντα σε αναερόβιο σχεδόν περιβάλλον και προστατεύονται από το οξυγόνο, χρησιμοποιώντας αντιοξειδωτικές ενώσεις. Πρόκειται για οίνους που παλαιώνουν στην φιάλη, μετά από παραμονή σε βαρέλι (1-2 χρόνια), και αναπτύσσουν το άριστο των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών σε αναγωγικό περιβάλλον (Σουφλερός, 2012). Ένα από τα πιο εντυπωσιακά συστήματα παλαίωσης οίνου είναι το κλασματικό σύστημα solera. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται κυρίως από τους Ισπανούς για την παλαίωση του sherry. Αν και εξ αρχής φαίνεται πολύπλοκη εντούτοις η δομή του συστήματος solera δημιουργήθηκε για να εξυπηρετήσει μια βασική αρχή, την σταθερή ποιότητα οίνου ή αποστάγματος ανεξάρτητα από τη χρονιά, τον καιρό ή τον τρύγο. Και πώς το πετυχαίνει αυτό; Φανταστείτε μια πυραμίδα από βαρέλια (Εικόνα 3) όπου το κάθε επίπεδο περιέχει οίνο ή απόσταγμα διαφορετικής χρονιάς με το παλαιότερο στο κάτω επίπεδο (που ονομάζεται solera) και το νεότερο στην κορυφή. Κάθε φορά που αφαιρείται απόσταγμα για εμφιάλωση από την κάτω σειρά, την solera, αυτή συμπληρώνεται σε ποσοστό από την από πάνω της, δηλαδή από νεότερο κρασί ή απόσταγμα δημιουργώντας ένα νέο μείγμα (blend), κοκ. Έτσι η κάθε σειρά στην πυραμίδα περιέχει κλασματικό μείγμα από όλες τις από πάνω σειρές. Αν και είναι

δύσκολο να προσδιορίσει κανείς την ακριβή ηλικία παλαίωσης του κρασιού ή του αποστάγματος που βρίσκεται στη solera εντούτοις το αποτέλεσμα αποδεικνύεται εξαιρετικό κάθε χρονιά.

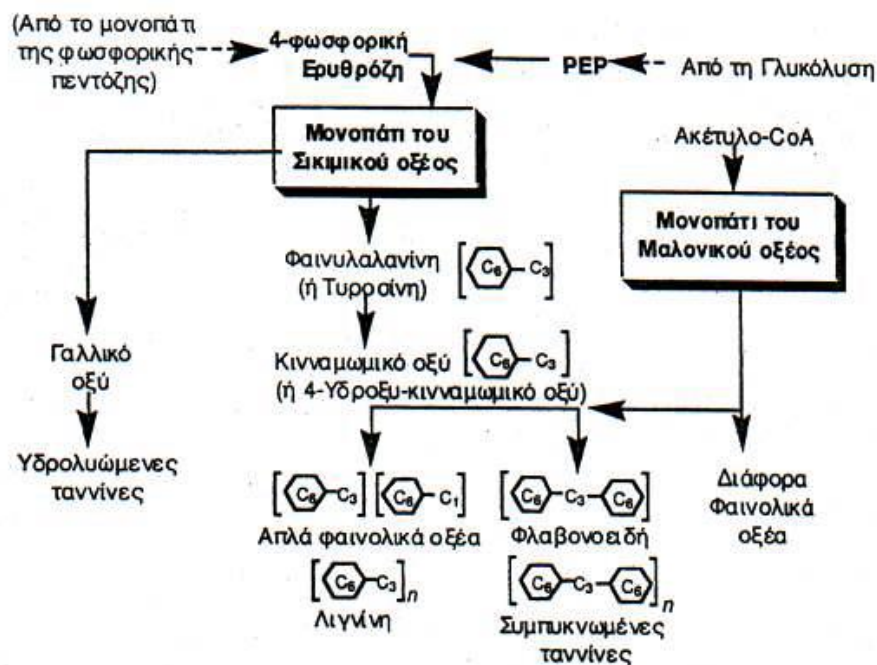


Εικόνα 3. Σύστημα solera

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι πολυφαινόλες, ιδιαίτερα αυτές που βρίσκονται φυσικά στα τρόφιμα, είναι ουσίες αυξανόμενου ενδιαφέροντος, κυρίως λόγω των βιολογικών ιδιοτήτων τους όπως αντιοξειδωτικές, αντι-θρομβωτικές, αντι-βακτηριακές, αντιαλλεργικές και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες που παρουσιάζουν (Hurtado-Fernández, et al., 2010). Όσον αφορά το σταφύλι, μετά τους υδατάνθρακες και τα οξέα, τα φαινολικά συστατικά αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα συστατικών της σταφυλής. Στον οίνο τα φαινολικά συστατικά βρίσκονται σε διάφορες συγκεντρώσεις. Αποτελούν δευτερεύοντα προϊόντα του καταβολισμού των σακχάρων, περιλαμβάνοντας ένα ευρύ φάσμα, μη ομογενών ουσιών. Λόγω της μεγάλης δραστηριότητας, τα φαινολικά παράγωγα σπάνια απαντώνται στους φυτικούς ιστούς σε ελεύθερη μορφή (Harborne, 1980). Βρίσκονται σχεδόν πάντοτε σε συζευγμένη μορφή α) με σάκχαρα, β) με αλκυλομάδες, γ) με οργανικά οξέα ως εστέρες, δ) με θειικά ιόντα και ε) με άλλα οργανικά μόρια όπως οργανικά οξέα, αμίνες, λιπίδια και τερπενοειδή. Η βιοσύνθεση φυτικών φαινολών από διάφορα μονοπάτια φαίνεται στην εικόνα 4. Το κοινό χαρακτηριστικό τους, είναι η παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου, με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Οι ενώσεις αυτές ως συστατικά του σταφυλιού και του οίνου περιέχουν ένα σύνολο ουσιών οι οποίες για μεγάλο χρονικό διάστημα- λόγω της μη ακριβούς γνώσης της δομής τους – ονομάζονταν γενικά και αόριστα “ταννινοειδής ύλη” ή “χρωστική ύλη” ή “οινοταννίνη” (Σουφλερός, 2012). Τα φαινολικά παράγωγα είναι μια μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων, αποτελούμενη από δευτερογενείς μεταβολίτες που εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες των φυτών. Κατά κύριο λόγο, η λειτουργία τους αφορά στην προστασία των φυτικών ιστών από μικρόβια και παθογόνα, την προστασία του φυτού από την υπερϊώδη ακτινοβολία, ενώ παράλληλα λειτουργούν ως ευνοϊκός παράγοντας για την ενίσχυση της γονιμότητας των γυρεόκοκκων (Boss et al., 1996). Αποτελούν σημαντικό κεφάλαιο της

οινολογίας, γιατί καθορίζουν το χρώμα και την απόχρωση των ερυθρών οίνων, αλλά και τους γευστικούς χαρακτήρες τους. Επίσης επηρεάζουν τους αρωματικούς χαρακτήρες των οίνων και ευθύνονται για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της ποιότητας τους κατά τη συντήρηση και παλαίωση.



Εικόνα 4. Βιοσύνθεση φυτικών φαινολών από διαφορετικά μονοπάτια. (Καράταγλης Σ., 1994)

Τέτοιες μεταβολές είναι για παράδειγμα η βελτίωση του οργανοληπτικού τους χαρακτήρα κατά την ωρίμαση υπό κατάλληλες συνθήκες, αλλά και το καφέτιασμα των λευκών οίνων και η εμφάνιση του καστανού θολώματος, που συμβαίνουν όταν δεν προστατεύονται τα φαινολικά συστατικά από τις οξειδώσεις. Οι αλλοιώσεις του χρώματος και των οργανοληπτικών χαρακτήρων των οίνων είναι αποτέλεσμα των χημικών και ενζυμικών οξειδωτικών δράσεων στα φαινολικά συστατικά (Κουράκου, 1998). Τα φαινολικά συστατικά του οίνου προέρχονται κυρίως από το σταφύλι, ενώ δευτερεύουσα πηγή τους είναι το ξύλο των βαρελιών. Πολύ μικρές ποσότητες τους, τέλος, σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των ζυμών. Ο ρόλος τους στο σταφύλι είναι κατά κύριο λόγο αντιμικροβιακός, αλλά σε μικρότερο βαθμό προστατεύουν από τις προσβολές από έντομα και από την κατανάλωση από ζώα (Jackson, 2008). Οι ταννίνες (προκυανιδίνες, συμπυκνωμένες και πολυμερισμένες ταννίνες), και οι ανθοκυάνες, ελεύθερες ή ενωμένες με ταννίνες, αποτελούν τις δύο μεγάλες τάξεις των φαινολικών παραγώγων. Βρίσκονται συγκεντρωμένες στα στερεά μέρη του σταφυλιού και περνούν στον οίνο με εκχύλιση ή διάχυση, κατά τις διάφορες τεχνικές παρασκευής των έγχρωμων οίνων. Στο μόριο αυτών των ουσιών υπάρχουν μία ή περισσότερες δραστικές φαινολικές ομάδες. Οι ουσίες αυτές κατατάσσονται σε δύο

κατηγορίες, τις πολυμοριακές και τις μονομοριακές φαινόλες. Οι πολυμοριακές φαινόλες έχουν βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα (C6-C3-C6), του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη και λέγονται «φλαβονοειδείς φαινόλες», με κύριους εκπροσώπους τις ταννίνες και τις ανθοκυάνες. Τα φαινολικά συστατικά, εκτός από χαρακτήρα ποιότητας, αποτελούν και μηχανισμό άμυνας για τα πρέμνα. Συγκεκριμένα, λόγω της χρωμοφορικής φύσεως του δακτυλίου των φλαβονοειδών ενώσεων, μπορούν να απορροφούν το υπεριώδες και το υπέρυθρο χρώμα, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο τα φυτά από τη UV ακτινοβολία (Smith and Markham, 1998). Συστατικά, όπως οι ανθοκυάνες, που απορροφούν και τα δύο φάσματα βοηθούν επίσης, στην ομαλή εξέλιξη της γονιμοποίησης ενώ αποτελούν ευνοϊκό παράγοντα της γονιμότητας των γυρεόκοκκων. Επιπλέον, έχουν και προστατευτική δράση κατά των μυκήτων και των βακτηρίων (Boss and Davies, 2001, Downey et al., 2006). Οι μονομοριακές φαινόλες, όπως το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ ανήκουν στις μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις. Υπάρχουν δύο γενικές προσεγγίσεις για τον καθορισμό και την ποσοτικοποίηση των περιεχόμενων πολυφαινολών στα τρόφιμα και συνεπώς στον οίνο. Το πρώτο είναι ο προσδιορισμός του συνολικού δείκτη (ολικά φαινολικά) με φασματοφωτομετρική ανίχνευση, συνήθως πραγματοποιείται με τη χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu ή την απορρόφηση μετρήσεων στα 280 nm (Luque de Castro, et al., 2005). Η δεύτερη προσέγγιση αφορά τον διαχωρισμό των διαφορετικών φαινολικών ουσιών ξεχωριστά, συνήθως με HPLC (αέρια χρωματογραφία) (Kalili and deVilliers, 2011) ή τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Hurtado-Fernández et al., 2010). Η χημική πολυπλοκότητα αυτών των ενώσεων, οι παρεμβολές που υπάρχουν στον οίνο και η προβληματική εξαγωγή τους από το δείγμα είναι τα κύρια προβλήματα που εμποδίζουν την ακριβή εκτίμηση του δείκτη των ολικών φαινολικών ουσιών (Blasco, et al., 2005).

1.1 Χημεία των φαινολικών παραγώγων

Εξ ορισμού, η επωνυμία φαινολικά παράγωγα υποδηλώνει ότι στο μόριο αυτών των ουσιών υπεισέρχονται μία ή περισσότερες δραστικές φαινολικές ομάδες. Η ταξινόμησή τους περιλαμβάνει δύο μεγάλες κατηγορίες: τις φλαβονοειδείς και τις μη φλαβονοειδείς φαινόλες. Στην κατηγορία των φλαβονοειδών φαινολών υπάγονται οι πολυμοριακές φαινόλες με βασικό χημικό τύπο C6-C3-C6 (Πίνακας 2), ο οποίος αντιστοιχεί στη φλαβονόνη (από την οποία απορρέει και το όνομα της κατηγορίας αυτής). Στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολών υπάγονται μονομοριακά φαινολικά παράγωγα, τα οποία ανευρίσκονται στους φυτικούς ιστούς και τα διάφορα φυτικά προϊόντα. (Κουράκου, 1998, Castañeda et al., 2009). Φαινόλες ονομάζονται τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια σε αντικατάσταση ισάριθμων υδρογόνων συνδεδεμένων με τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου. Τα βενζολικά παράγωγα με υδροξύλιο σε αντικατάσταση υδρογόνου της πλευρικής αλυσίδας ονομάζονται αρωματικές αλκοόλες και όχι φαινόλες (Κουράκου, 1998). Η ευκινησία των ηλεκτρονίων του δακτυλίου του βενζολίου δημιουργεί το φαινόμενο του συντονισμού (μεσομέρεια). Πρόκειται για τη μετατόπιση των ηλεκτρονίων των τριών διπλών δεσμών του βενζολικού πυρήνα και των δύο ζευγών ηλεκτρονίων του οξυγόνου. Η μετατόπιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση θετικού φορτίου επί του οξυγόνου (άρα ευκολότερη μετακίνηση του υδρογόνου ως πρωτονίου) και ενός αρνητικού φορτίου σε κάποια κορυφή του δακτυλίου, σε όρθο ή πάρα θέση. Στο φαινόμενο του συντονισμού οφείλεται η σταθερότητα του βενζολικού δακτυλίου, με συνέπεια να σπάει πολύ δύσκολα, ενώ δίνει αντιδράσεις αντικατάστασης και σπάνια προσθήκης. Συμπερασματικά, η εμφάνιση ηλεκτρικών φορτίων στα μόρια των ανθοκυανών

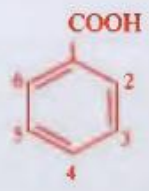
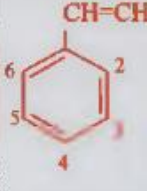
και των ταννινών τους δίνει τη δυνατότητα να συμπεριφέρονται ως ηλεκτρονιόφιλα ή πυρηνόφιλα αντιδραστήρια και ως εκ τούτου συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανθοκυανών-ταννινών (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Στις φαινόλες δημιουργούνται διαμοριακές συζεύξεις με δεσμό υδρογόνου. Το υδρογόνο τείνει να ενωθεί με οξυγόνο, είτε του ίδιου, είτε άλλου μορίου. Έτσι οι ενδομοριακές συζεύξεις είναι συνηθισμένες στα φαινολικά παράγωγα. Επίσης η παρουσία δεσμού υδρογόνου μειώνει τη δραστηριότητα των φαινολικών ομάδων, όπως τη διαλυτότητα σε αλκαλικό διάλυμα και την ικανότητα σχηματισμού εστέρων και αιθέρων. Οι φαινόλες δεν εστεροποιούνται εύκολα στη φύση, αντίθετα με τις αλκοόλες, και οι λίγοι εστέρες που απαντούν στα φαινολικά παράγωγα αποτελούν ένωση μεταξύ της όξινης ομάδας ενός φαινολικού οξέος και του αλκοολικού υδροξυλίου ενός άλλου μορίου, δηλαδή είναι εστέρες οξέων-αλκοολών και όχι οξέων-φαινολών. Αντίθετα, ο σχηματισμός αιθέρων είναι πολύ πιο συνηθισμένος, κυρίως με φαινολική ομάδα και με μεθυλική αλκοόλη. Οι φαινολαιθέρες (γουαϊακόλη, ευγενόλη) έχουν ευχάριστη συνήθως οσμή και είναι αρωματικά συστατικά των οίνων. Οι ανθοκυάνες αποτελούνται από ένα άγλυκο φαινολικό συστατικό (C6-C3-C6) και ένα αλδεϋδοσάκχαρο, συνήθως γλυκόζη. Η συνήθης μορφή της γλυκόζης σε ελεύθερη κατάσταση είναι η ημιακεταλική, αφού το καρβονύλιο αντιδρά με το αλκοολικό οξύ της θέσης -4 και σχηματίζεται ένας ετεροκυκλικός εξαμελής δακτύλιος, το πυράνιο. Όταν ένα από τα φαινολικά -OH του άγλυκου φαινολικού συστατικού αντιδράσει με το -OH του άνθρακα της ημιακετάλης, σχηματίζεται ακετάλη. Συνεπώς οι ανθοκυάνες είναι ετεροζίτες, όπου το άγλυκο και το σάκχαρο είναι συνδεδεμένα με ακεταλικό δεσμό και όχι με αιθερικό. Επειδή οι ακετάλες υδρολύονται εν θερμώ σε όξινο περιβάλλον, είναι δυνατή η μελέτη των φυσικών ετεροζιτών και των άγλυκων των φαινολικών συστατικών, μεταξύ των οποίων και οι ανθοκυανιδίνες, δηλαδή το άγλυκο των ανθοκυανών. Η οξειδωση των φαινολών έχει μεγάλη σημασία στην οινολογία. Το πρώτο στάδιο είναι η δημιουργία μιας ελεύθερης ρίζας, με ένα άτομο οξυγόνου μονοσθενές με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο, με την απομάκρυνση του -H από το φαινολικό -OH. Λόγω του φαινομένου του συντονισμού, σχηματίζεται ρίζα που σε θέση ο- ή π- έχει ένα τρισθενές άτομο άνθρακα με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Αυτές οι ρίζες είναι πολύ ασταθείς και αντιδρούν γρήγορα μεταξύ τους ή με άλλη ρίζα, σχηματίζοντας δεσμούς C-C, C-O και O-C. Στη συνέχεια, οξειδώσεις των προϊόντων οξειδωσης και οξειδώσεις με υπόστρωμα διάφορα σύνθετα φαινολικά παράγωγα, οδηγούν σε πολυμερισμένα παράγωγα με καστανόμαυρο χρώμα. Σε τέτοιους μηχανισμούς αποδίδεται το καφέτιασμα των οίνων (Κουράκου, 1998). Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην οξειδωση των φαινολικών συστατικών είναι οι πολυφαινολοξειδάσες. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι οξειδοαναγωγάσες ή τυροσινάσες που βρίσκονται σε υγρή σταφύλια και η λακκάση που βρίσκεται σε σταφύλια προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea*. Οι τυροσινάσες οξειδώνουν τις διφαινόλες και τις μονοφαινόλες σε κινόνες. Τα ένζυμα αυτά είναι μερικώς διαλυτά στο γλεύκος, έχουν μειωμένη δραστηριότητα μετά τη διαύγαση, είναι αρκετά ευαίσθητα στο διοξείδιο του θείου και απομακρύνονται κατά την κατεργασία με μπεντονίτη. Ο μηχανισμός της οξειδωσης ξεκινά με τη δράση της τυροσινάσης, παρουσία οξυγόνου, στα υδροξυκιναμμωμικά οξέα, η οποία οδηγεί στην παραγωγή κινόνων. Αυτό είναι και το πρώτο στάδιο της καστανώσης, ενώ οι επόμενες αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό καστανών χρωστικών και άλλων προϊόντων, δεν είναι ενζυμικές. Οι κινόνες τότε μετέχουν στον σχηματισμό άλλων προϊόντων και σε αντιδράσεις συμπύκνωσης και οξειδωσης. Είναι γεγονός πως οινοποιητικές πρακτικές όπως η παρατεταμένη επαφή με τα στέμφυλα και η έντονη πίεση, ενισχύουν την τάση του οίνου προς την καστανώση (Nunez-Delicato, et al., 2007, Sanchez-

Ferrer, et al., 1988, Weemaes, et al., 1998, Ho, et al., 1999). Τέλος αναφέρεται πως οι φλαβονοειδείς φαινόλες έχουν στο μόριο τους έναν δακτύλιο πυρυλίου που τους προσδίδει χαρακτηριστικές ιδιότητες, κάποιες από τις οποίες χρησιμοποιούνται κατά την ανάλυση των ανθοκυανών. Συγκεκριμένα το μόριο των φυσικών φλαβονοειδών φαινολών αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους ενωμένους με πυρυλικό δακτύλιο και μπορεί να είναι ή όχι επίπεδο, ανάλογα με τους δεσμούς των τριών ατόμων άνθρακα του πυρυλίου (Κουράκου, 1998).

1.2 Μη φλαβονοειδείς φαινόλες

Η παρουσία τους στους οίνους οφείλεται είτε στο σταφύλι, όπου ανευρίσκονται στους φλοιούς και τη σάρκα, είτε στο ξύλο των βαρελιών, όπου γίνεται η παλαίωση. Οι ερυθρές ποικιλίες και οίνοι περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τις λευκές ποικιλίες και οίνους (Ribereau-Gayon, 2000). Κύριοι εκπρόσωποι είναι τα φαινολοξέα (Εικόνα 5) και ειδικότερα τα παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος, των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ανθράκων του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξυλομάδες και μεθόξυ ομάδες, και τα στυλβένια (Κουράκου, 1998, Κοτσερίδης, 2006). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντιβακτηριακή δράση που εμφανίζουν πολλά από τα φαινολοξέα. Λόγω των μικρών ποσοτήτων που απαντούν στις σταφυλές, δε θεωρείται ότι επεμβαίνουν στην οινοποιητική πρακτική, όμως συγκαταλέγονται στους παρεμποδιστές της ανάπτυξης των βακτηρίων και ερμηνεύουν μερικώς τη δυσκολία εκδήλωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αυτό συμβαίνει γιατί τα βακτήρια, έχοντας ενζυματικό μηχανισμό λιγότερο πλήρη σε σχέση με τις ζύμες, είναι αρκετά ευαίσθητα ακόμη και σε μικρές δόσεις αντισηπτικών και αντιβιοτικών (Κουράκου, 1998, Κοτσερίδης, 2005). Τα φαινολοξέα απαντούν στα σταφύλια ως ετεροζίτες ή εστέρες (ταννίνες γαλλικού και ελλαγικού), όμως κατά την οινοποίηση και συντήρηση των οίνων υδρολύονται αργά, με όξινη υδρόλυση οι ετεροζίτες και με αλκαλική οι εστέρες, με αποτέλεσμα στους οίνους να βρίσκονται και σε ελεύθερη μορφή. Στους ερυθρούς οίνους οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται από 100 έως 200 mg/L, ενώ στους λευκούς από 10 έως 20 mg/L. Από τα βενζοϊκά οξέα το σταφύλι περιέχει κυρίως γαλλικό οξύ, το οποίο βρίσκεται συνήθως υπό τη μορφή εστέρων των φλαβανολών-3 (κατεχινών). Από τα κινναμωμικά οξέα, μια μικρή ποσότητα βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, τα περισσότερα είναι εστεροποιημένα, κυρίως με τρυγικό οξύ, ενώ κάποια είναι ενωμένα με γλυκόζη. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι και τα επικρατέστερα στο σταφύλι και βρίσκονται στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού και της σάρκας υπό τη μορφή των εστέρων με τρυγικό οξύ (καφεοτρυγικό, π-κουμαροτρυγικό, φερούλοτρυγικό). Οι εστέρες αυτοί είναι ιδιαίτερα ευοξειδωτά συστατικά του γλεύκους και ευθύνονται για το καφέτισμα των λευκών γλευκών. Τα κινναμωμικά οξέα συνδυάζονται με ανθοκυανικούς μονογλυκοζίτες, προς σχηματισμό ακυλιωμένων ανθοκυανών, μέσω της εστεροποίησης του καφεϊκού και του π-κουμαρικού οξέος με τη γλυκόζη του γλυκοζίτη (Ribereau-Gayon, et al., 2006, Κοτσερίδης, 2006). Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα όταν βρίσκονται σε αλκοολικό διάλυμα, αλλά αποκτούν κίτρινο χρώμα όταν οξειδωθούν. Δεν έχουν ιδιαίτερη γεύση ή οσμή, αλλά αποτελούν πρόδρομες ενώσεις πτητικών φαινολών που παράγονται από κάποιους μικροοργανισμούς, όπως ζύμες του γένους *Brettanomyces* και ορισμένα βακτήρια. Το ψήσιμο (toasting) στο οποίο υποβάλλεται το ξύλο που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή δρύινων βαρελιών έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση της λιγνίνης και το σχηματισμό διάφορων προϊόντων με οσμές καπνιστού, ψημένου ή

καμένου, όπως είναι η γουαϊακόλη, η μεθυλγουαϊακόλη, η προπυλγουαϊακόλη, η ισοευγενόλη, η συρινγγόλη και η μεθυλσυρινγγόλη. Οι ενώσεις αυτές εκχυλίζονται στους οίνους που παλαιώνουν στα καινούρια αυτά δρύινα βαρέλια (Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Proestos, et al., 2005). Άλλη μια ένωση της ίδιας ομάδας είναι η τυροσόλη, η οποία απαντάται σε ερυθρούς και λευκούς οίνους. Παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση από την τυροσίνη. Η τυροσόλη, της οποίας η συγκέντρωση παραμένει σχετικά σταθερή κατά την παλαίωση του οίνου, συνυπάρχει με άλλες μη φαινολικές αλκοόλες. Οι κουμαρίνες είναι παράγωγα του κινναμωμικού οξέος και σχηματίζονται από την ενδομοριακή εστεροποίηση ενός φαινολικού ΟΗ. Είναι συστατικά του ξύλου της δρυός, είτε σε γλυκοζιτική μορφή στο πράσινο ξύλο, είτε σε άγλυκη μορφή στο ώριμο ξύλο. Αν και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (μg/L), απαντώνται σε οίνους που έχουν παλαιώσει σε βαρέλια, επηρεάζοντας τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες. Σαν γλυκοζίτες είναι πικρές και σε άγλυκη μορφή είναι όξινες, με κατώφλι αντίληψης σε ερυθρούς οίνους τα 3 μg/L (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Άλλη μια οικογένεια που αποτελείται από περισσότερο πολύπλοκες πολυφαινόλες και απαντώνται σε σταφύλια, οίνους, είναι τα στυλβένια. Πρόκειται για ενώσεις με δύο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται συνήθως με ένα αιθάνιο ή πιθανώς με μια αιθυλενική αλυσίδα. Μεταξύ αυτών των trans ισομερών συγκαταλέγεται και η ρεσβερατρόλη ή αλλιώς το 3,5,4'-τριυδροξυστυλβένιο, ενώ απαντάται και το παράγωγό της με γλυκόζη. Παράγεται σε περιπτώσεις στρες, όπως μετά από προσβολή από μύκητες. Βρίσκεται στους κυρίως στους φλοιούς, (υπάρχει και στα γίγαρτα), και η συγκέντρωση διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία. Εκχυλίζεται κυρίως κατά την αλκοολική ζύμωση των ερυθρών οίνων. Η συγκέντρωσή της κυμαίνεται από 1 έως 3 mg/L και έχει διαπιστωθεί πως είναι ευεργετική για την υγεία (Κοτσερίδης, 2006, Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Dell' Agli et al., 2004, Nikfardjam, et al., 2006, Scheiber, et al., 2002).

Βασικό οξύ	Βασικός τύπος	Όνομασία φαινολοξέων	Θέση πρόσθετων ομάδων	
			- OH	- OCH ₃
Βενζοϊκό		σαλικυλικό οξύ	2	
		π-υδροξυβενζοϊκό οξύ	4	
		γαλλικό οξύ	3, 4, 5	
		πρωτοκατεχινικό οξύ	3, 4	
		βανιλλικό οξύ	4	3
		συριγγικό οξύ	4	3, 5
		γεντισικό οξύ	2, 5	
Κινναμωμικό		π-κουμαρικό οξύ	4	
		καφεϊκό οξύ	3, 4	
		χλωρογενικό οξύ	3, 4	
		φερουλικό οξύ	4	3

Εικόνα 5. Τα κυριότερα φαινολοξέα των σταφυλιών (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982)

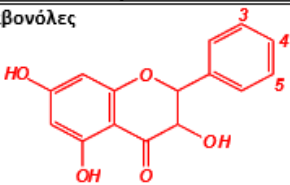
1.2.1 Φλαβονοειδείς ενώσεις

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα (C₆-C₃-C₆) του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη. Χωρίζονται σε πολλές ομάδες οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του πυρανικού δακτυλίου. Με την αυστηρή έννοια του όρου και με βάση τη δομή της 2-φαινυλ-βενζοπυρόνης, τα φλαβονοειδή αντιπροσωπεύονται μόνο από τις φλαβονόλες του σταφυλιού ενώ με την ευρεία έννοια του όρου συμπεριλαμβάνονται οι ανθοκυάνες και οι φλαβαν-3-όλες (Κοτσερίδης, 2006).

1.2.2 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες (Εικόνα 6) ή 3-υδροξυ-φλαβόνες ή ανθοξανθίνες (λόγω του ανοιχτού κίτρινου χρώματος) απαντούν μόνο στους φλοιούς των ραγών (στις στιβάδες του υποδέρματος), τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών σταφυλιών, υπό μορφή γλυκοζιτών στη θέση 3 ή μονογλυκουρονοζιτών-3. Σχηματίζονται με την προσκόλληση στη θέση -3 του κεντρικού δακτυλίου (βενζοπυρόνη) ενός μορίου μονοσακχαρίτη (κυρίως γλυκόζης) ή ενός μορίου γλυκουρονικού οξέος. Αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των φυτών (Κουράκου, 1998, Κοτσερίδης, 2005). Στην κατηγορία των φλαβονοειδών φαινολών περιλαμβάνονται οι

πολυφαινόλες με 15 άτομα C (C6-C3-C6) του τύπου 2-φαινύλ-βενζοπυρόνη. Χωρίζονται σε πολλές ομάδες, οι οποίες διαχωρίζονται ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του πυρανικού δακτυλίου. Με βάση τη δομή της 2-φαινύλ-βενζοπυρόνης, αντιπροσωπεύονται μόνο από τις φλαβονόλες της σταφυλής, ενώ με την ευρεία έννοια του όρου συμπεριλαμβάνονται και οι ανθοκυάνες και οι φλαβανόλες-3. Στο σταφύλι βρέθηκαν οκτώ μονογλυκοζίτες και τρεις διγλυκοζίτες των φλαβονολών. Οι μορφές των γλυκοζιτών (με γλυκόζη) απαντούν σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες, αλλά βρίσκονται και σημαντικές ποσότητες των εστέρων τους με το γλυκουρονικό οξύ. Τα άλλα σάκχαρα που απαντούν είναι η γαλακτόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη. Τόσο οι λευκές, όσο και οι ερυθρές ποικιλίες αμπέλου περιέχουν τις ίδιες ποσότητες φλαβονολών, διαφέρουν όμως στην ποιοτική τους σύσταση. Η περιεκτικότητα των φλαβονολών ποικίλει από 10 έως 100 mg/kg ραγών. Τα παράγωγα της κερκετίνης είναι πάντα κυρίαρχα, ενώ αυτά της μυρικετίνης και του γλυκοζίτη-3 της ισοραμνετόλης φαίνεται ότι απαντούν μόνο στις λευκές ποικιλίες. Στους ερυθρούς οίνους απαντούν στην ποσότητα των 100 mg/L περίπου, ενώ στους λευκούς 1-3 mg/L (Κοτσερίδης, 2006).

Βασική ένωση	Βασικός τύπος	Άγλυκο φαινολικό παράγωγο	Θέση πρόσθετων ομάδων	
			- OH	- OCH ₃
		Καμπφερόλη	4	
		Κερκετρίνη (3-ραμνοζίτης)	3, 4	
		Μυρικετρίνη (3-ραμνοζίτης)	3, 4, 5	
		Ισοραμνετόλη	4	3

Εικόνα 6. Οι κυριότερες φλαβονόλες (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982)

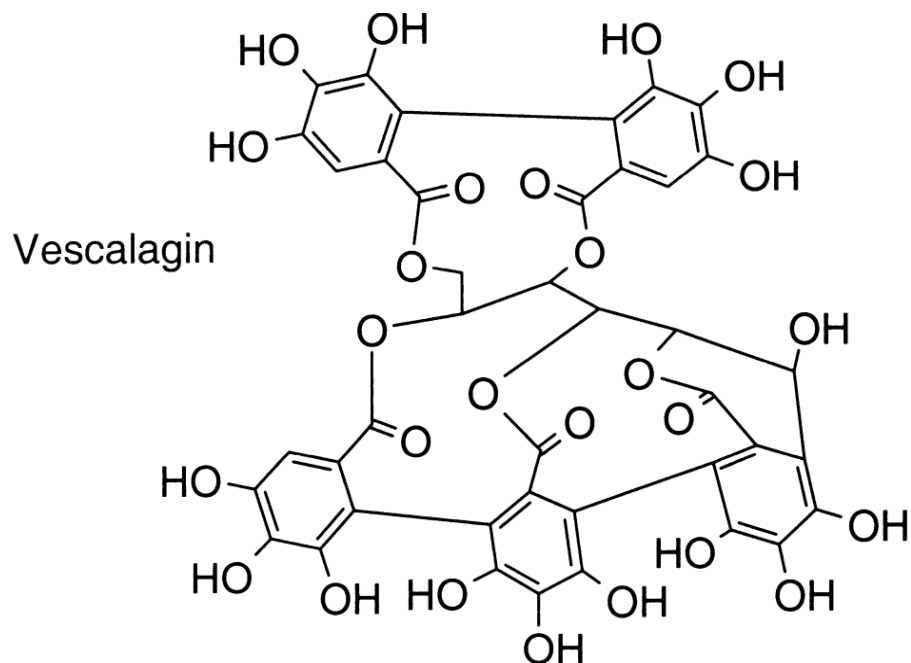
1.3 Ταννίνες

Το όνομά τους προέρχεται από την κελτική λέξη ‘tan’ που σημαίνει βελανιδιά, στα φύλλα της οποίας σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες των ουσιών αυτών. Οι ενώσεις αυτές δεν παρουσιάζουν καμία ομοιομορφία στη χημική τους δομή και για αυτό προσπάθειες που έγιναν για να δοθεί συγκεκριμένος ορισμός απέτυχαν. Έτσι, για να οριστούν οι ταννίνες γίνεται χρήση των ιδιοτήτων τους, οι οποίες συνίστανται στο να συνενώνονται με τις πρωτεΐνες ή άλλα πολυμερή – όπως οι πολυσακχαρίτες – σχηματίζοντας αδιάλυτες ενώσεις (Σουφλερός, 2012). Οι ταννίνες απαντούν σε διάφορα είδη φυτών. Η σύνθεσή τους είναι εντονότερη μετά από κάποιο τραυματισμό του φυτικού ιστού, όπου καταστρέφονται τα κύτταρα και η υπάρχουσα διαμερισματοποίηση τους. Λόγω αυτής της καταστροφής, οι πολυφαινολικές οξειδάσες έρχονται σε επαφή με τα φαινολικά υποστρώματα όπως το

γαλλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τα φλαβονοειδή. Η οξειδωση των φαινολικών ενώσεων από τις πολυφαινολικές οξειδάσες παράγει κινόνες, οι οποίες πολυμερίζονται και σχηματίζουν ταννίνες. Οι τελευταίες θεωρούνται προστατευτικές ουσίες απέναντι στην προσβολή των φυτών από μικροοργανισμούς. Από χημική άποψη, οι ταννίνες είναι μεγαλομόρια με φαινολικό δακτύλιο, που προκύπτουν από τον πολυμερισμό στοιχειωδών μορίων με φαινολική ομάδα. Είναι ουσίες ικανές να δώσουν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Για να δώσουν σταθερές ενώσεις με τις πρωτεΐνες πρέπει να είναι ογκώδεις, αλλά όχι υπερβολικά διότι στην περίπτωση αυτή ενδέχεται να μη μπορούν να ενωθούν με τις δραστικές θέσεις των πρωτεϊνών. Τα Μ.Β. των δραστικών ταννινών κυμαίνονται από 600 έως 3.500 (Ribéreau-Gayon et al., 2000, Κοτσερίδης, 2005). Ανάλογα με τη φύση της βασικής μονάδας, οι ταννίνες διακρίνονται σε συμπυκνωμένες (ή ταννίνες της κατεχίνης) και σε υδρολυόμενες (ή ταννίνες του γαλλικού οξέος). Η μεγάλη διαφοροποίηση στη δομή των ενώσεων – διμερείς, τριμερείς, ολιγομερείς, συμπυκνωμένες – εξηγεί την παρουσία, στις σταφυλές των διαφόρων ποικιλιών και στους αντίστοιχους οίνους, ταννινών με διαφορετικές ιδιότητες, ιδίως γευστικές. Η θέρμανση των ταννινών σε όξινο περιβάλλον οδηγεί στο σχηματισμό κυρίως ερυθρής κυανιδίνης, αποδίδοντάς τους τον όρο προκυανιδίνες (Κοτσερίδης, 2005).

1.3.1 Υδρολυόμενες ταννίνες

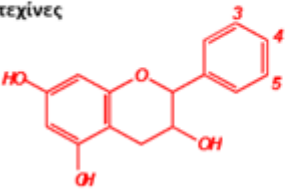
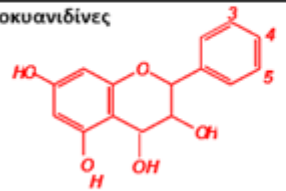
Οι ταννίνες της φύσης διακρίνονται στις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις ταννίνες των οίνων. Αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κυρίως γλυκόζης, ή ένα μόριο πολυσακχαρίτη, του οποίου πολλά –OH είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολοξέα, εκ των οποίων σημαντικότερα είναι το γαλλικό, το διγαλλικό και το ελλαγικό. Τέτοιες ταννίνες αφθονούν στο ξύλο της δρυός, οπότε οι οίνοι που παλαιώθηκαν σε ξύλινα βαρέλια περιέχουν διάφορες μικροποσότητες γαλλικού και ελλαγικού οξέος που είναι προϊόντα υδρόλυσης των ταννινών του ξύλου (Κουράκου, 1998). Αναφέρονται συχνά και σαν γαλλοταννίνες ή ελλαγικές ταννίνες (Εικόνα 7). Τα μόρια αυτά είναι υδατοδιαλυτά και καθιζάνουν γρήγορα σε μέσα τα οποία περιέχουν αλκοόλη όπως είναι οι οίνοι και τα μπράντυ (Moutounet et al., 1989). Παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην παλαίωση των ερυθρών και λευκών οίνων σε δρύινα βαρέλια, εξαιτίας της οξειδωσιμότητάς τους (Vivas and Glories, 1993, 1996) και των ιδιοτήτων της γεύσης τους (Pocock et al., 1994). Η σύσταση του ελλαγιταννικού περιεχομένου του ξύλου της δρυός εξαρτάται από το είδος της. Τέσσερις μονομερείς και τέσσερις διμερείς ελλαγιταννίνες (ρομπουρίνη Α, Β, C και D) απαντώνται στις ευρωπαϊκές δρυς, ενώ οι αμερικάνικες έχουν μόνο διμερείς. Εκτός από τις ταννίνες που προέρχονται από τα δρύινα βαρέλια, υδρολυόμενες είναι και οι οινολογικές ταννίνες που χρησιμοποιούνται για τη διαύγαση του οίνου. Οπότε σε οίνους που έχουν υποστεί κολλάρισμα με προσθήκη ταννίνης, βρίσκονται και υδρολυόμενες ταννίνες, εκτός από τις συμπυκνωμένες, που είναι φυσικά συστατικά του. Το ελλαγικό οξύ που βρίσκεται στους οίνους προέρχεται πάντα από το ξύλο ή την προσθήκη οινολογικής ταννίνης, ενώ το γαλλικό, επειδή υπάρχει στους φλοιούς και στα γίγαρτα, είναι πάντα παρόν (Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Matejicek, et al., 2005).



Εικόνα 7. Ελλαγική ταννίνη από ξύλο δρυός (Waterhouse A. L., 2002)

1.3.2 Προκυανιδίνες

Οι προκυανιδίνες (Εικόνα 8) απαντούν στους φλοιούς, κυρίως όμως στα γίγαρτα των ραγών της σταφυλής. Από έρευνες που έγιναν σχετικά με την παρουσία των προκυανιδινών σε σταφυλές, διαπιστώθηκε ότι απαντώνται κατά μεγάλο ποσοστό στα γίγαρτα και το οποίο κατά μέσο όρο αγγίζει το 56%. Στους βοστρύχους και τους φλοιούς, οι εν λόγω ουσίες απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό περί το 20%, ενώ ο χυμός είναι απαλλαγμένος αυτών των ουσιών. Δεν έχουν τη μορφή γλυκοζιτών, ενώ έχουν τη δυνατότητα να ενωθούν με πολυσακχαρίτες της σταφυλής και να εκχυλιστούν ως σύμπλοκα κατά την οινοποίηση (Ribéreau-Gayon, 2000). Λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα των ερευνητικών εργασιών προκύπτει ότι, τελικά, οι ουσίες που διαμορφώνουν τη δομή και το «σώμα» των ερυθρών οίνων και καθορίζουν την αντοχή τους στο χρόνο, βρίσκονται στα γίγαρτα (Κουράκου, 1998).

Βασική ένωση	Βασικός τύπος	Αγλυκο φαινολικό παράγωγο	Θέση πρόσθετων ομάδων	
			-OH	-OCH ₃
Κατεχίνες 		Κατεχίνη	3, 4	
		Γαλλοκατεχίνη	3, 4, 5	
Προκυανιδίνες 		Προκυανιδίνη	3, 4	
		Προδελφινιδίνη	3, 4, 5	
		Προμαλβιδίνη	4	3, 5
		Προπετουνιδίνη	4, 5	3

Εικόνα 8. Οι κυριότερες κατεχίνες και προκυανιδίνες (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982)

1.3.3 Πολυμερισμός προκυανιδινών

Ιδιαίτερα χρήσιμη είναι η γνώση των βασικών αντιδράσεων πολυμερισμού των προκυανιδινών. Τα όξινα διαλύματα των διμερών, ολιγομερών και πολυμερών προκυανιδινών είναι ασταθή. Ακόμα και σε ατμόσφαιρα αζώτου, παρουσία διοξειδίου του θείου, χωρίς φώς, το χρώμα αρχικά κιτρινίζει, μετά γίνεται καφέ και σύντομα ακολουθεί καθίζηση. Σε pH 3,2 η αντίδραση διαρκεί δέκα μήνες, στους 5°C, λιγότερους μήνες στους 20 °C και μόνο έναν με δύο μήνες στους 30 °C. Παρουσία οξυγόνου και ειδικά σε υψηλές θερμοκρασίες, η μετατροπή αυτή είναι εντονότερη και τα ιζήματα έχουν διαφορετική μορφή. Σε όξινο περιβάλλον χωρίς οξυγόνο, οι προκυανιδίνες σχηματίζουν καρβοκατιόν το οποίο μπορεί εύκολα να αντιδράσει με τα αρνητικά φορτία των κορυφών 6 και 8 του δακτυλίου A μιας άλλης προκυανιδίνης, αυξάνοντας έτσι τον βαθμό πολυμερισμού της. Οι πολυμερισμένες προκυανιδίνες, συνεπώς, παράγονται από τον πολυμερισμό C4-C8 ή C4-C6 που λέγεται «οργανωμένος πολυμερισμός». Αντίθετα, σε ένα ισχυρά οξειδωτικό περιβάλλον, παράλληλα με τον (μη οργανωμένο) οξειδωτικό πολυμερισμό των προκυανιδινών, σχηματίζονται και ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα, λόγω οξειδώσεων, τη δημιουργία μοριακών συσσωματωμάτων μεγάλου όγκου, τα οποία καθιζάνουν. Στην περίπτωση ελεγχόμενου αερισμού (σίνος σε βαρέλι), σχηματίζεται ακεταλδεύδη, από την οξείδωση της αλκοόλης. Η ακεταλδεύδη ευθύνεται για την τροποποίηση της δομής των προκυανιδινών, δεδομένου ότι ο πολυμερισμός μέσω της ακεταλδεύδης είναι πολύ πιο γρήγορος και παράγονται πολυμερή τα οποία είναι πιθανό να κατακαθίσουν, ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού τους και τη συγκέντρωσή τους. Η ακεταλδεύδη σε όξινο περιβάλλον πρωτονιώνεται και παράγει ένα αρχικό καρβοκατιόν που ενώνεται με τα αρνητικά φορτία

των κορυφών 6 ή 8 των φλαβονολών (Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Κοτσερίδης, 2006). Ένας διαφορετικός πολυμερισμός έχει προσδιοριστεί και βασίζεται σε αλδεύδες, γλυοξυλικό οξύ, φουρφουράλη, μεθυλφουρφουράλη και άλλες. Τα σύμπλοκα που προκύπτουν είναι κίτρινα και έχουν δομή ξανθιού. Το γλυοξυλικό οξύ σχηματίζεται από την οξειδωση του τρυγικού οξέος. Η φουρφουράλη βρίσκεται στα σαπισμένα σταφύλια, αλλά επίσης μπορεί να ελευθερωθεί από το ξύλο των βαρελιών, ανάλογα με το βαθμό του ψησίματος που αυτό έχει υποστεί. Πρόκειται για μια απλή αντίδραση, που ξεκινάει με το σχηματισμό σταυροδεσμού μεταξύ δύο φλαβονομάδων σε όξινο περιβάλλον και συνεχίζει με αφυδάτωση και κυκλοποίηση. Το φλαβένιο που σχηματίζεται οξειδώνεται και παράγεται κίτρινος δακτύλιος ξανθιού. Η αντίδραση αυτή συνεισφέρει στη δημιουργία της κίτρινης απόχρωσης που έχουν οι οξειδωμένοι οίνοι και αυτοί που έχουν παραχθεί από σταφύλια προσβεβλημένα από βοτρυτή (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

1.3.4 Κατεχίνες και προκυανιδίνες στους οίνους

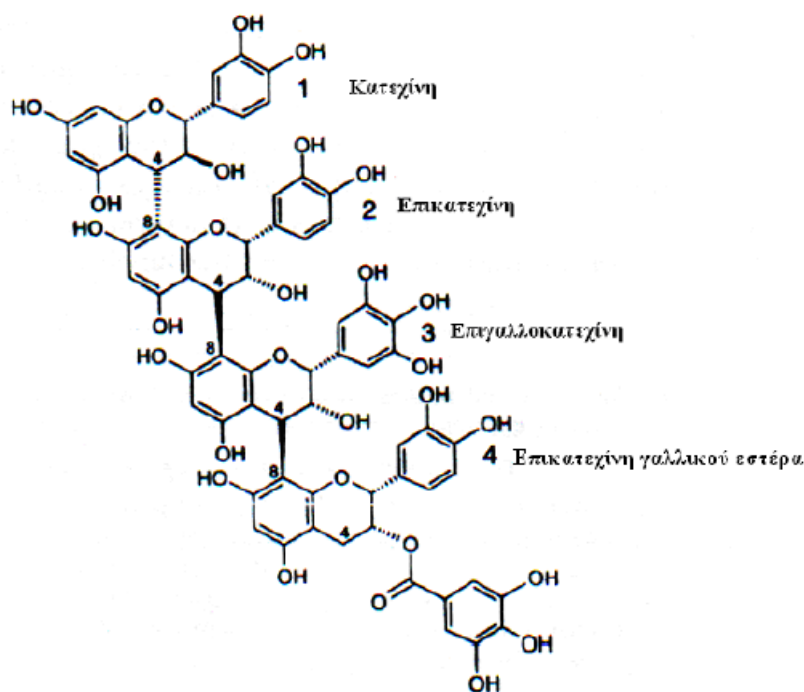
Η περιεκτικότητα του οίνου σε κατεχίνες και προκυανιδίνες, όπως είναι αναμενόμενο, εξαρτάται κατά πολύ από την ποικιλία του αμπελιού όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Όσον αφορά στην οινοποίηση, στην πρώτη φάση της ερυθρής, οι φλοιοί είναι πολύ σημαντικοί, εξαιτίας της ταχύτητας με την οποία εκχυλίζονται τα ευδιάλυτα μονομοριακά φλαβονοειδή παράγωγα, που αφθονούν στους φλοιούς, με κύρια την (+) κατεχίνη. Όσο μεγαλώνει ο χρόνος παραμονής του εν ζυμώση γλεύκους με τα στέμφυλα, μεγαλώνει ο ρόλος των γιγάρτων, που είναι πλούσια σε κατεχίνη και επικατεχίνη, αλλά κυρίως σε προκυανιδίνες. Τα συστατικά αυτά βρίσκονται σχεδόν στην πλειοψηφία τους στον εξωτερικό μαλακό χιτώνα των γιγάρτων. Οι οίνοι δεν περιέχουν τόσες προκυανιδίνες όσες τα σταφύλια, γιατί η εκχύλιση είναι ατελής, ενώ κάποια ποσότητα προσροφάτε από τους φλοιούς και από άλλα αιωρούμενα στερεά. Επίσης οι προκυανιδίνες ενώνονται με πρωτεΐνες, οξειδώνονται προς μη φαινολικά παράγωγα και πολυμερίζονται προς αδιάλυτα σύμπλοκα που καθιζάνουν. Όπως είναι φυσικό, τα μονομοριακά ευδιάλυτα φαινολικά παράγωγα εκχυλίζονται ευκολότερα σε σχέση με τα συμπυκνωμένα, ενώ στην περίπτωση που πρόκειται για πολυμερισμό τεσσάρων μονάδων και άνω, δεν συμβαίνει καθόλου εκχύλιση (Κουράκου, 1998).

Πίνακας 1. Κατανομή των φλαβαν-3-όλων εντός του σταφυλιού (Bourzeix, et al. 1986)

Ποικιλίες	Μονομερή (mg/kg)	Ποσοστό γιγάρτων	Προκυανιδίνες (mg/kg)	Ποσοστό στα γίγαρτα
Alicante-Bouchet	360	64	287	50
Aramon	213		182	
Syrah	190		176	
Mourvedre	164	58	169	53

Grenache noir	137		125	
Cinsaut	136	37	116	32
Carignan	77	54	73	40
Cabernet Sauvignon	344	83	546	68
Pinot noir	1.165	94	1.609	86

Έτσι, σε νέους οίνους η πλειοψηφία των προκυανιδινών είναι διμερείς και τριμερείς, ενώ οι ερυθροί οίνοι περιέχουν είκοσι φορές περισσότερες προκυανιδίνες σε σχέση με τους λευκούς (Jackson, 2008). Η περιεκτικότητα ενός ερυθρού οίνου σε ταννίνες εξαρτάται από την ποικιλία και ιδιαίτερα από τις συνθήκες οινοποίησης και κυμαίνεται μεταξύ των 1 έως 4 g/L. στην περίπτωση των λευκών οίνων επηρεάζεται από την ένταση της απολάσπωσης και είναι της τάξης των 100 mg/L, όταν γίνει σωστή απολάσπωση και 200-300 mg/L σε οίνους από μη απολασπωμένα γλεύκη (Κοτσερίδης, 2006). Κατά την παλαίωση, οι προκυανιδίνες, με αργό ρυθμό, σχηματίζουν πολυμερή που περιλαμβάνουν αλυσίδες μήκους 8 έως 14 μονάδων. Το μοριακό βάρος των ταννινών αυτών κυμαίνεται από 2.000 έως πάνω από 5.000 (Jackson, 2008). Οι αλυσίδες τους σχηματίζουν ένα είδος σκελετού, στον οποίο προστίθενται και άλλα μόρια (πεπτιδία, πολυσακχαρίτες, ανόργανα στοιχεία, νερό, τρυγικό οξύ). Η παρεμβολή πολυσακχαριτών και πεπτιδίων απενεργοποιεί τις ταννικές ιδιότητες των συμπυκνωμένων ταννινών, μειώνοντας τη δραστηριότητα επί των πρωτεϊνών και επομένως προκαλείται γευστικό μαλάκωμα των οίνων, όταν αυτοί παλαιώνουν υπό κατάλληλες συνθήκες. Στους οίνους εκχυλίζονται κατά τη διάρκεια της συμπαραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος. Στην Εικόνα 9 απεικονίζεται μια υποθετική συμπυκνωμένη ταννίνη αποτελούμενη από 4 υπομονάδες κατεχίνης, επικατεχίνης, επιγαλλοκατεχίνης και ο γαλλικού εστέρας της επικατεχίνης. Είναι ένα τετραμερές όπου η κατεχίνη, η επικατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη αποτελούν τις δομικές υπομονάδες οι οποίες έχουν έναν διαφλαβανικό δεσμό μεταξύ του C4 και του C8 της παρακείμενης υπομονάδας. Ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης είναι η τελική μονάδα στην οποία ο C4 είναι ελεύθερος και το γαλλικό οξύ είναι εστεροποιημένο με την καρβοξυλική ομάδα του C3. Η κατεχίνη και η επικατεχίνη αποτελούν τις βασικές δομικές μονάδες των ταννινών της σταφυλής που βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, με την επικατεχίνη να βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από την κατεχίνη (Adams, 2006).

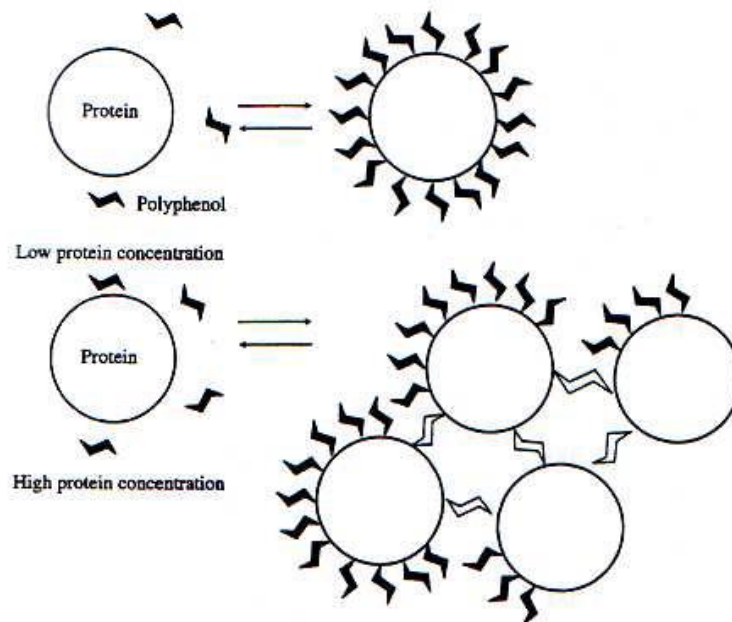


Εικόνα 9. Αυτή η υποθετική συμπυκνωμένη ταννίνη αποτελείται από 4 υπομονάδες: κατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη και ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης. Η πρώτη υπομονάδα (κατεχίνη) ενώνεται με την δεύτερη (επικατεχίνη) με διαφλαβανικό δεσμό μεταξύ του C4 της κατεχίνης και του C8 της επικατεχίνης. Ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης είναι η τελική μονάδα στην οποία ο C4 είναι ελεύθερος και το γαλλικό οξύ είναι εστεροποιημένο με την καρβοξυλική ομάδα του C3 (Adams, 2006).

1.3.5 Αντιδράσεις των ταννινών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες

Οι πολυφαινόλες και ιδιαίτερα οι ταννίνες είναι ικανές να σχηματίζουν σταθερούς συνδυασμούς με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες (Asano et al., 1982). Το μοντέλο αλληλεπιδράσεων μεταξύ ταννινών και πρωτεϊνών περιγράφηκε από τον Haslam το 1981 και ισχύει ακόμη και σήμερα (Εικόνα 10). Οι δύο κύριοι τρόποι σύνδεσης είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου, ενώ οι ιοντικοί ή οι ομοιοπολικοί δεσμοί έχουν δευτερεύουσα σημασία. Όταν η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι μικρή, οι πολυφαινόλες ενώνονται σε ένα ή περισσότερα σημεία της επιφάνειας της πρωτεΐνης, σχηματίζοντας μια μονή στοιβάδα, λιγότερο υδρόφιλη από την πρωτεΐνη. Έτσι οι πρωτεΐνες συσσωματώνονται και συνεπώς καθιζάνουν. Όταν η συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυξηθεί, οι φαινολικές ενώσεις διασπείρονται στην επιφάνειά τους, όπως προηγουμένως, ενώ ταυτόχρονα σχηματίζονται γέφυρες από ταννίνες μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών. Δηλαδή οι ταννίνες δρουν σαν σύνδεσμοι ή σαν παράγοντες σταυροδεσμών, μεταξύ των διάφορων μορίων πρωτεϊνών. Η επιφανειακή υδρόφοβη στοιβάδα τότε ανασυνδέεται και προκαλείται καθίζηση των πρωτεϊνών. Επομένως οι σχετικές συγκεντρώσεις ταννινών και πρωτεϊνών επηρεάζουν το σχηματισμό και την καθίζηση των συμπλόκων μεταξύ τους. Ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του pH, του χρόνου αντίδρασης, της θερμοκρασίας, των διαλυτών και των ιοντικών δυνάμεων, επηρεάζουν τη δημιουργία των

συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνών και ταννινών. Μεγάλη σημασία έχει το μέγεθος, η δομή και το φορτίο των ταννινών και η σύστασή τους, αν είναι δηλαδή ενωμένες με ανθοκυάνες, πολυσακχαρίτες ή αν είναι συμπυκνωμένες. Το φορτίο των ταννινών είναι διαφορετικό ανάλογα με τη δομή τους και εξαρτάται από το pH του μέσου. Επιπλέον, ο τύπος και το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών έχουν μεγάλη σημασία στη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων. Μεγάλη σημασία έχουν χαρακτηριστικά όπως η σύσταση σε αμινοξέα, η δομή στο χώρο, το μέγεθος και το φορτίο των πρωτεϊνών. Οι Hagerman και Butler (1980), έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες με υψηλή περιεκτικότητα σε προλίνη έχουν μεγάλη συνάφεια με τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Η ιδιότητα αυτή επιδρά στις οργανοληπτικές ιδιότητες των ταννινών στους ερυθρούς οίνους και είναι σημαντική σχετικά με τη διαύγηση, κάτι που εξηγεί τη σημασία της σύστασης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται για τη διαύγηση (Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Mateus, et al., 2004).

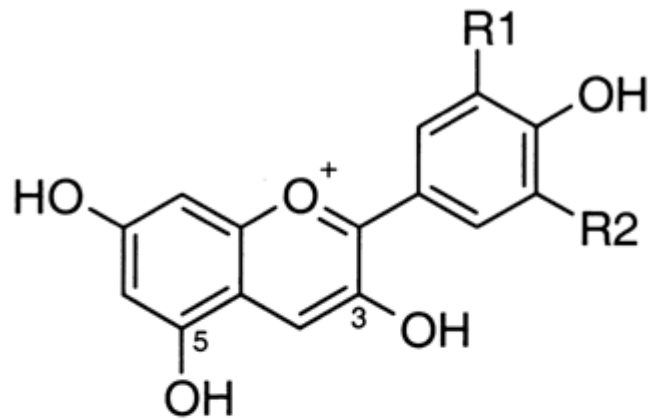


Εικόνα 10. Μοντέλο καταβύθισης των πρωτεϊνών από τις πολυφαινόλες (Haslam, 1981)

1.4 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες αποτελούν ίσως τη σημαντικότερη κατηγορία των φαινολικών συστατικών της σταφυλής, καθώς είναι οι ερυθρές χρωστικές στις οποίες οφείλουν το πορφυρό, ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό ή ιώδες χρώμα τους (Κουράκου, 1998). Απαντούν μόνο στο φλοιό των ραγών των *cv vinifera*, πλην των 'βαφικών ποικιλιών' στις οποίες βρίσκονται στη σάρκα των ραγών (π.χ. Alicante bouschet) ή ορισμένων ραγών σε στάδιο υπερωρίμανσης, λόγω γήρανσης κυττάρων και διάχυσης χρωστικών στη σάρκα. Αποτελούν έναν εξαιρετικό χημικό δείκτη για τον χαρακτηρισμό ενός δείγματος σταφυλιών και οίνου δεδομένου ότι αποτελούν το ορατό μέρος του πλούτου τους σε φλαβονοειδείς φαινόλες. Τα σταφύλια περιέχουν 30-750 mg/100gr. Στα σταφύλια βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς, αλλά στις μαύρες ποικιλίες υπάρχουν και στη σάρκα. Επίσης απαντώνται σε μεγάλες ποσότητες στα φύλλα, κυρίως στο

τέλος της ανάπτυξής τους (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Για πρώτη φορά απομονώθηκε ανθοκυάνη από σταφύλι το 1879 και από τότε αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών (Mantell, et al., 2002, Kosir, et al., 2004). Οι ανθοκυάνες, σε αντίθεση με το σύνολο των φαινολών, μπορούν να αποτελέσουν καθοριστικό παράγοντα για την κατάταξη των οινοποιήσιμων ποικιλιών (Kallithraka, et al., 2001, Nunez, et al., 2004). Απαντούν στη φύση σε μορφή ετεροζιτών, οι οποίοι ως ακετάλες, υδρολύονται εύκολα προς ένα άγλυκο και ένα ή περισσότερα μόρια σακχάρων. Τα άγλυκα τμήματα λέγονται ανθοκυανιδίνες και έχουν τύπο C6-C3-C6. Έχουν τη βασική δομή του φλαβυλίου (Εικόνα 11), το μόριό τους αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους, που περιβάλλουν ένα δακτύλιο πυρυλίου. Ο δακτύλιος 1 φέρει πάντα δύο φαινολικά -OH στις θέσεις -5 και -7 και ο δακτύλιος 2 ένα φαινολικό -OH στη θέση -4' (Brouillard, et al., 2003, Κουράκου, 1998). Από τις εννέα ανθοκυανιδίνες που είναι γνωστές οι τρεις δεν έχουν -OH στη θέση -3 και είναι σπάνιες. Οι έξι που είναι πολύ διαδεδομένες, έχουν -OH στη θέση -3 και στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ανθοκυανιδίνες των έγχρωμων σταφυλιών και οίνων. Οι διαφορές μεταξύ τους περιορίζονται στον αριθμό των -OH και -OCH₃ των θέσεων R1 και R2, ο οποίος επηρεάζει τη σταθερότητα και το χρώμα της ανθοκυάνης (Κουράκου, 1998). Με την αύξηση των ελεύθερων υδροξυλομάδων αυξάνεται το μπλε χρώμα, ενώ το κόκκινο ενισχύεται ανάλογα με την αύξηση του βαθμού μεθυλίωσης (Jackson, 2008). Από τις ανθοκυανιδίνες των σταφυλιών και των οίνων η πιο διαδεδομένη είναι η κυανιδίνη, παρά το γεγονός ότι είναι, μαζί με τη δελφινιδίνη, η πιο ασταθής, λόγω των φαινολικών -OH σε ο-θέση (Εικόνα 11).



R1, R2

H, OH; cyanidin

H, OCH₃; peonidin

OH, OH; delphinidin

OH, OCH₃; petunidin

OCH₃, OCH₃; malvidin

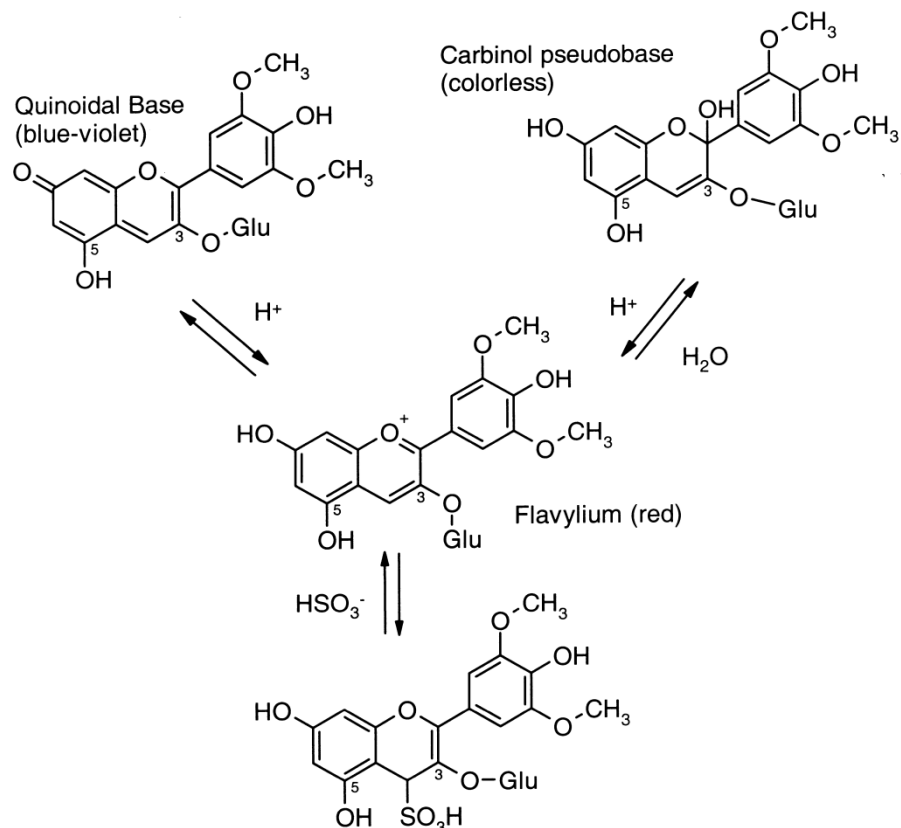
Εικόνα 11. Δομή ανθοκυανών (Waterhouse A. L., 2002)

Αυτές οι δύο είναι και οι πρόδρομοι ανθοκυανιδίων σταθερότερων μορφών, όπως η παιονιδίνη και η μαλβιδίνη, που δεν έχουν $-OH$ σε ο-θέση. Έτσι στα σταφύλια ερυθρών ποικιλιών μετά τον περκασμό εμφανίζεται η κυανιδίνη και η συγκέντρωσή της αυξάνεται, όπως της δελφινιδίνης, τις πρώτες δεκαπέντε μέρες ωρίμανσης, τελικά όμως επικρατεί κατά πολύ η μαλβιδίνη (Εικόνα 11), που είναι η κύρια ανθοκυανιδίνη όλων σχεδόν των σταφυλιών και των έγχρωμων οίνων. Όσον αφορά τα σάκχαρα των ανθοκυανών, όλες οι γνωστές έχουν ένα στη θέση -3, στην οποία το $-OH$ έχει ειδικές ιδιότητες, η γλυκοζιδίωση του είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση του μορίου (Κουράκου, 1998, Jackson, 2008, Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Beckman, 2000). Ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης αποτελεί τη βάση του χρώματος των ερυθρών σταφυλιών και οίνων, ενώ η ακυλιωμένη μορφή του διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία (Κοτσερίδης, 2006). Συνήθως στις ελληνικές ερυθρές ποικιλίες αμπέλου είναι η παρουσία του μονογλυκοζίτη-3 της μαλβιδίνης, ακυλιωμένου με οξικό οξύ, κυρίως όμως με π-κουμαρικό οξύ (Κουράκου, 1998). Στην ποικιλία Αγιωργίτικο απαντώνται και οι δύο ακυλιωμένες μορφές της μαλβιδίνης (Kallithraka, et al., 2006). Εάν στην ανθοκυάνη υπάρχει και δεύτερο σάκχαρο, αυτό βρίσκεται πάντα στη θέση -5. Τα σάκχαρα των ανθοκυανών είναι πάντα αλδόζες και κυρίως γλυκόζη, με την ετεροκυκλική μορφή του πυρανίου. Επίσης στη φύση είναι διαδεδομένες οι ακυλιωμένες ανθοκυάνες, στις οποίες το αλκοολικό $-OH$ της θέσης -6 του σακχάρου είναι εστεροποιημένο με ένα οργανικό οξύ της αλειφατικής ή της αρωματικής σειράς. Οι ανθοκυάνες των σταφυλιών είναι πάντα μονοσακχαρίτες και κυρίως μονογλυκοζίτες (στην *Vitis vinifera*, ενώ διγλυκοζίτες απαντούν μόνο στα υβρίδια) και σε πολλές ποικιλίες το μόριο της γλυκόζης είναι ακυλιωμένο με οξικό, π-κουμαρικό ή καφεϊκό οξύ (Κουράκου, 1998, Jackson, 2008, Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Bao Do, et al., 1995).

1.4.1 Δομή και ιδιότητες των ανθοκυανών

Το πυρύλιο του μορίου των ανθοκυανιδίων χαρακτηρίζεται από σταθερότητα λόγω της ύπαρξης των δύο διπλών δεσμών του. Λόγω της παρουσίας του πυρυλίου (ιόν οξωνίου με θετικά φορτισμένο το άτομο του οξυγόνου) οι ανθοκυανιδίνες συμπεριφέρονται ως κατιόντα και συνδυάζονται πάντα με ένα ανιόν. Μεταξύ της ερυθρής μορφής του φλαβυλίου και μιας άχρωμης μορφής ψευδοβάσης, υπάρχει μια ισορροπία που εξαρτάται από το pH (Κοτσερίδης, 2006, Κουράκου, 1998, Darias-Marin, et al., 2001). Σε οίνους με pH 3,0 το 50% των ανθοκυανών βρίσκονται στην έγχρωμη μορφή και το υπόλοιπο στην άχρωμη (Κουράκου, 1998). Σε υψηλότερα pH το ποσοστό των έγχρωμων ανθοκυανών μειώνεται (20-25% σε pH 3,4-3,6 και μόνο 12% σε pH 3,8 και 10% σε pH 4,0) (Κουράκου, 1998, Jackson, 2008). Σε pH > 4,0 το χρώμα τους μεταβάλλεται από μωβ σε μπλε και σε pH ουδέτερα ή αλκαλικά γίνεται κίτρινο (Κοτσερίδης, 2006). Εκτός από τις δύο αυτές μορφές, οι ανθοκυάνες βρίσκονται στους οίνους υπό άλλες δύο μορφές, την άνυδρη βάση υπό μορφή κίνονης με χρώμα κυανό (Εικόνα 12) και τη χαλκόνη που είναι άχρωμη, ή έχει ελαφρό κίτρινο χρώμα. Και οι τέσσερις μορφές των ανθοκυανών βρίσκονται σε ισορροπία που εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία. Με μείωση του pH αυξάνεται το ποσό των ερυθρών φλαβυλίων (Κουράκου, 1998). Μια αξιοσημείωτη μείωση του ερυθρού χρώματος επέρχεται από τις αλλαγές των ισορροπιών μεταξύ των μορφών των ανθοκυανών, ως αποτέλεσμα της αύξησης του pH (Κοτσερίδης, 2006). Η παρουσία δύο δραστικών φαινολικών $-OH$ σε ο-θέση στα μόρια των κατεχινών, των προκυανιδίων και ορισμένων ανθοκυανών, τις καθιστούν ευαίσθητα υποστρώματα χημικών και ενζυμικών οξειδώσεων. Η

οξειδωση των ελεύθερων ανθοκυανών αποσταθεροποιεί το χρώμα των ροζέ οίνων και των ερυθρών οίνων πρώιμης κατανάλωσης (Κουράκου, 1998, Heredia, et al., 1998). Εκτός από τη λακκάση, οι περισσότερες πολυφαινολοξειδιάσες επηρεάζουν μόνο τις ο-διφαινόλες. Επειδή ούτε η μαλβιδίνη, ούτε η παιονιδίνη έχουν υδροξυλομάδες σε όρθο θέση, είναι σχετικά ανθεκτικές στην οξειδωση (Jackson, 2008). Το χρώμα των ανθοκυανών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι η μοριακή δομή τους, η υποκατάσταση του πλευρικού δακτυλίου, η ένωση με τη γλυκόζη και η ακυλίωση της. Πράγματι, αφ' ενός η υποκατάσταση του πλευρικού δακτυλίου μετατοπίζει το μέγιστο της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (φαινόμενο βαθυχρωμίας), αφ' εταίρου η ένωση με τη γλυκόζη και η ακυλίωση της μετατοπίζουν το μέγιστο της απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος (φαινόμενο υψιχρωμίας). Εκτός όμως από τη βαθυχρωμία, όπου το χρώμα πλησιάζει προς το μωβ, έχουμε και το φαινόμενο της υπερχρωμίας, όπου αυξάνεται η ένταση του χρώματος, σε περίπτωση ένωσης των ανθοκυανών με ορισμένα συστατικά του οίνου (Κοτσερίδης, 2006, Boulton, 2001). Σε αναγωγικό περιβάλλον το διάλυμα των ελεύθερων ανθοκυανών αποχρωματίζεται μόνιμα απουσία αέρα, όμως ανάλογα με τις συνθήκες το χρώμα επανέρχεται. Σε αυτή την ιδιότητα οφείλεται το γεγονός ότι ο νέος οίνος μέσα στη δεξαμενή ερυθρής οινοποίησης, αμέσως μετά την αποζύμωση, έχει ανοιχτότερο χρώμα από αυτό που αποκτάει μετά την πρώτη μετάγγιση. Όπως είναι γνωστό, η θείωση προκαλεί μερικό αποχρωματισμό στους νέους οίνους, γιατί το ανιόν SO_3H^- συνδέεται με τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα στη θέση -2 του πυρυλίου με αποτέλεσμα το σχηματισμό άχρωμης ένωσης. Το ποσοστό του αποχρωματισμού εξαρτάται από το pH, τον ελεύθερο SO_2 και τη συγκέντρωση των ελεύθερων ανθοκυανών. Όσο περισσότερες είναι οι ελεύθερες ανθοκυάνες και όσο μεγαλύτερο είναι το pH, τόσο μικρότερος είναι ο αποχρωματισμός, αφού στα υψηλά pH μειώνεται ο αριθμός των μορίων των ανθοκυανών που βρίσκονται στη μορφή του φλαβυλίου (A^+). Η αντίδραση των ανθοκυανών με το θειώδη ανυδρίτη είναι αμφίδρομη. Όταν με την επίδραση του οξυγόνου η αλκοόλη οξειδώνεται προς ακεταλδεΰδη, που έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το θειώδη ανυδρίτη, ο ελεύθερος SO_2 του οίνου μειώνεται λόγω δέσμευσής του από την αλδεϋδομάδα, άρα η ένωση ανθοκυάνη $-\text{SO}_3\text{H}^-$ ελευθερώνει θειώδη ανυδρίτη προς αποκατάσταση της ισορροπίας. Εκτός αυτού και οι ταννίνες έχουν ιδιαίτερη σημασία, αφού, σαν πυρηνόφιλες ενώσεις αντιτίθενται στην προσθήκη πυρηνόφιλου αντιδραστήριου, όπως είναι το $-\text{SO}_3\text{H}^-$, στο μόριο των ανθοκυανών, ενώ ακόμα αποσταθεροποιούν το μόριο $\text{A}-\text{SO}_3\text{H}^-$, όταν έχει σχηματιστεί. Έτσι το χρώμα βαθμιαία επανέρχεται. Πάντως ο αποχρωματισμός με θειώδη ανυδρίτη συμβαίνει μόνο στους νέους οίνους, όπου το μεγαλύτερο μέρος των ανθοκυανών είναι ελεύθερο, ενώ στους παλιούς έχει ήδη επέλθει συμπύκνωση και πολυμερισμός των ανθοκυανών, που με αυτές τις μορφές δεν ενώνονται με θειώδη ανυδρίτη (Κουράκου, 1998).



Εικόνα 12. Μορφές ανθοκυανών που βρίσκονται στον οίνο. (Waterhouse A. L., 2002)

1.4.2 Σύμπλοκα ανθοκυανών

Η εξαιρετική δραστηριότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου του μορίου των φλαβονοειδών φαινολών ευνοεί το σχηματισμό ενδοφλαβονικών δεσμών. Έτσι τα μόρια των κατεχινών έχουν την τάση να ενώνονται προς σχηματισμό διμερών παραγώγων, οι προκυανιδίνες να πολυμερίζονται προς ταννίνες και οι ανθοκυάνες να ενώνονται με ταννίνες προς πολυμερή ταννινών-ανθοκυανών, που αντίθετα με τις ελεύθερες ανθοκυάνες, έχουν αρκετή σταθερότητα. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο οι ταννίνες σταθεροποιούν το χρώμα των ερυθρών οίνων. Όταν τα πολυμερή είναι μικρού μοριακού βάρους, έχουμε τις συμπυκνωμένες ανθοκυάνες, στις οποίες το μόριο εξακολουθεί να έχει μορφή φλαβυλίου και να είναι έγχρωμο. Αντίθετα, σε πολυμερή υψηλού βαθμού συμπύκνωσης επικρατεί το χρώμα της ταννίνης, οπότε έχουμε τις πολυμερισμένες ανθοκυάνες. Σε αυτές οφείλεται το κεραμιδί χρώμα που αποκτούν οι ερυθροί οίνοι παλαιώνοντας. Το χρώμα των παλαιών οίνων οφείλεται σε ταννίνες, ή σε πολυμερή ταννινών-ανθοκυανών μεγάλης συμπύκνωσης και σχεδόν καθόλου σε ελεύθερες ανθοκυάνες (Κουράκου, 1998). Εκτός από τις ταννίνες, οι ανθοκυάνες δημιουργούν έγχρωμα σύμπλοκα και με άλλες ανθοκυάνες, καθώς και με άλλες οργανικές ενώσεις, συνήθως άχρωμες, με συνέπεια το σχηματισμό συσσωματωμάτων που διατηρούνται εξαιτίας δεσμών χαμηλής ενέργειας, δηλαδή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου (Hermosin-Gutierrez, et al., 2005, Κοτσερίδης, 2006). Τέτοιες ενώσεις είναι φλαβονοειδείς και μη φλαβονοειδείς, αμινοξέα (κυρίως προλίνη και αργινίνη),

οργανικά οξέα, πολυσακχαρίτες και πουρίνες. Όλα αυτά τα σύμπλοκα αυξάνουν την ένταση και την απόχρωση και σταθεροποιούν το χρώμα των ερυθρών οίνων (Jackson, 2008). Το φαινόμενο, σύμφωνα με τους Brouillard και Dangles (1994), μπορεί να περιγραφεί ως η υδρόφοβη ένωση μιας ανθοκυάνης με ένα άχρωμο συστατικό. Δηλαδή πρόκειται για μια διάταξη που προστατεύει το φλαβύλιο από το νερό, παρεμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό ημικεταλικών δομών και χαλκονών. Κάθε διαταραχή στο πλέγμα του ύδατος, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας, η προσθήκη άλλου διαλύτη (π.χ. αιθανόλη) ή η προσθήκη ενός άλατος, μειώνει την ένταση του φαινομένου. Σε ένα υδραλκοολικό διάλυμα, όπως ο οίνος, δημιουργείται γύρω από την άχρωμη ουσία ένα πρώτο περίβλημα από τα μόρια του οργανικού διαλύτη και αυτό περιβάλλεται από ένα πιο υδατικό περιβάλλον (Gonzalez-Manzano, et al., 2009, Castaneda-Ovado, et al., 2009, Κοτσερίδης, 2006, Tzanova-Savona, et al., 2002). Η διατήρηση των ανθοκυανών σε συμπλοκοποιημένη κατάσταση εμποδίζει την ενυδάτωση του φλαβυλίου και της βάσης κινόνης, που οδηγεί σε σχηματισμό άχρωμων ενώσεων. Και οι δύο αυτές έγχρωμες καταστάσεις των ανθοκυανών διευκολύνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ τους, με άλλα μόρια ανθοκυανών, αλλά και με τα σύμπλοκα των ανθοκυανών με οργανικές ενώσεις, καθιστώντας τις πιο πιθανές. Σε χαμηλές τιμές του pH η συμπλοκοποίηση με οργανικές ενώσεις γίνεται κυρίως με ανθοκυάνες που βρίσκονται στη μορφή φλαβυλίου, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση της ισορροπίας των ελεύθερων ανθοκυανών προς την κατεύθυνση της κατάστασης του φλαβυλίου. Έτσι έχουμε ενίσχυση του χρωματισμού και η απόχρωση τείνει προς το μωβ. Η συμπλοκοποίηση αυτή συνεισφέρει στο χρωματισμό των νέων οίνων κατά 30-50%. Τα σύμπλοκα μεταξύ ανθοκυανών διατηρούνται από υδρόφιλες έλξεις μεταξύ των μορίων γλυκόζης και από υδρόφοβες απώσεις από το νερό. Στην περίπτωση των δυνατότερων και πιο σταθερών συμπλόκων των ανθοκυανών με άλλες ενώσεις, σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των ακυλομάδων των ανθοκυανών και των ενώσεων αυτών. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι ανθοκυάνες συμπλοκοποιούνται με πολλές διαφορετικές ενώσεις, στις οποίες όμως κυριαρχούν η επικατεχίνη, οι προκυανιδίνες, τα κινναμωμικά οξέα και οι υδροξυκινναμωμικοί εστέρες. Η διακύμανση της σχετικής αναλογίας μεταξύ αυτών των ενώσεων είναι έντονη μεταξύ οίνων της ίδιας ποικιλίας, που παράχθηκαν σε διαφορετικές περιοχές, κάτι το οποίο εξηγεί τις χρωματικές διαφορές μεταξύ των οίνων αυτών. Οι παράγοντες που οδηγούν στη διάσπαση των συμπλόκων των ανθοκυανών είναι πολλοί. Η θέρμανση των σταφυλιών ή του οίνου που πραγματοποιείται κατά τη θερμοοινοποίηση, για να αυξηθεί η εκχύλιση του χρώματος, αποσταθεροποιεί τα σύμπλοκα μεταξύ ανθοκυανών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη απώλεια χρώματος κατά την ωρίμανση του οίνου, σε περίπτωση που το ποσό των ταννινών δεν είναι επαρκές. Οι ταννίνες βέβαια ευνοούν τον σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων με τις ανθοκυάνες. Η αλκοόλη επίσης αποσταθεροποιεί τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συμπλόκων των ανθοκυανών, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση των μορίων του νερού (Jackson, 2008). Επειδή η αλκοόλη αντιτίθεται στην ένωση των ανθοκυανών με μη έγχρωμες φαινόλες, το χρώμα που οφείλεται σε αυτές τις ενώσεις χάνεται σε μερικούς μήνες και παραμένουν μόνο οι μονογλυκοζίτες των πέντε ανθοκυανών (Κοτσερίδης, 2006). Συνεπώς όταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης το γλεύκος βρίσκεται σε επαφή με τα στέμφυλα για μικρό χρονικό διάστημα, είναι αναμενόμενη μια έντονη μείωση του χρώματος, όσο η ζύμωση συνεχίζεται, παρά το γεγονός ότι η ποσότητα των ανθοκυανών παραμένει σταθερή. Η μείωση του χρώματος εξαρτάται από την ποσότητα των φαινολικών ουσιών, το pH και την περιεκτικότητα σε αλκοόλη, και αποδίδεται στη μείωση της απορρόφησης, καθώς τα σύμπλοκα των ανθοκυανών διασπώνται. Μέσα στα σύμπλοκα περιέχονται ανθοκυάνες που

βρίσκονται στην κατάσταση της βάσης κινόνης, οι οποίες αποχρωματίζονται καθώς περνάνε στο όξινο περιβάλλον του οίνου. Αν και μειώνεται, η συμπλοκοποίηση των ανθοκυανών μεταξύ τους ενδέχεται να είναι η αιτία των μωβ αποχρώσεων που χαρακτηρίζουν κάποιους νέους οίνους. Η διατήρηση του οίνου σε χαμηλές θερμοκρασίες, διευκολύνει τη δημιουργία συμπλόκων μεταξύ ανθοκυανών και άλλων ενώσεων και επιβραδύνει τη διάσπασή τους. Εξαιτίας του γεγονότος ότι η συνένωση των μορίων βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία με τις ελεύθερες ανθοκυάνες, ερυθροί οίνοι με ασθενές χρώμα και μικρό περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες, παρουσιάζουν περισσότερη διάσπαση συμπλόκων και μεγαλύτερη απώλεια χρώματος, από αυτή που θα ήταν αναμενόμενη δεδομένης της περιεκτικότητάς τους σε ανθοκυάνες. Επιπλέον τα μόρια των ανθοκυανών έχουν την τάση να υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες, χάνοντας την ακυλομάδα τους και τα γλυκοζιδικά τους συστατικά. Οι διασπασμένες ανθοκυάνες είναι περισσότερο ευαίσθητες στην μη αντιστρέψιμη απώλεια χρώματος, αλλά και στην επίσης μη αντιστρέψιμη μετατροπή των έγχρωμων φλαβυλίων σε άχρωμες ημιακετάλες (Jackson, 2008).

1.5 Καθίζηση των έγχρωμων ενώσεων σε νέους οίνους

Εάν ένας νέος οίνος τοποθετηθεί στο ψυγείο αμέσως μετά την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, γρήγορα θα αποκτήσει θολερότητα και θα σχηματιστεί ίζημα. Η εμφάνιση αυτού του ιζήματος είναι τελείως διαφορετική από αυτού που προκύπτει σε φιάλες παλαιωμένου οίνου. Πρόκειται για ίζημα ζελατινώδες και έντονα λαμπερό κόκκινο με χαρακτηριστική στιλπνότητα. Είναι παρόμοιο με τα υπολείμματα που παραμένουν στα βαρέλια και τις δεξαμενές. Η σύνθεση αυτού του ιζήματος είναι σχετικά σταθερή: τρυγικά, ανθοκυάνες, ταννίνες και πολυσακχαρίτες. Η κατακρήμνιση του όξινου τρυγικού καλίου είναι γνωστό φαινόμενο. Η συμπεριφορά των φαινολικών συστατικών σχετίζεται με την κολλοειδή τους κατάσταση, σύμφωνα με διαπίστωση του Ribéreau-Gayon. Είναι δυνατό να αποφευχθεί η κατακρήμνιση με τη διάλυση στον οίνο αναγεννημένης κυτταρίνης (σελοφάν). Συγκεκριμένα, ο Ribéreau-Gayon το 1976 αναφέρει πως η φυσικοχημική μεταβολή που συμβαίνει στον οίνο κατά την παλαίωση σε βαρέλι και σε φιάλη έγκειται στο σχηματισμό αυτής της κολλοειδούς χρωστικής ουσίας, κυρίως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και στην κατακρήμνισή της κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Το χαρακτηριστικό αυτό το έχουν όλοι οι οίνοι, ορισμένοι από αυτούς σε μεγαλύτερο βαθμό, ειδικά όταν οι οινοποιητικές μέθοδοι προάγουν την έντονη εκχύλιση. Οι οίνοι έχουν επίσης περισσότερες κολλοειδείς χρωστικές εάν τα σταφύλια από τα οποία προέρχονται έχουν προσβληθεί από σήψη, έχουν υπερθερμανθεί κατά τη διάρκεια ζύμωσης σε υψηλές θερμοκρασίες, ή έχουν υποστεί μηχανική κατεργασία (έντονο σπάσιμο, άντληση, ανακάτεμα κ.λπ.). Όλα αυτά οδηγούν σε αναγκαστική εκχύλιση είτε μη υδρολυόμενων πολυσακχαριτών από τους φλοιούς των σταφυλιών, είτε εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών από τους μύκητες. Αυτά τα κολλοειδή είναι σχετικά ασταθή, ανάλογα με το μέγεθος του μορίου τους. Σχηματίζουν μια κολλοειδή βάση για τις χρωστικές ουσίες και χρωματίζονται από τα φαινολικά συστατικά κατά την κατακρήμνιση. Ο βαθμός κατακρήμνισης επίσης εξαρτάται από την περιεκτικότητα του οίνου σε αλκοόλ και τη θερμοκρασία αποθήκευσης.

1.5.1 Το χρώμα των ερυθρών οίνων

Το χρώμα στους παλαιωμένους ερυθρούς οίνους δεν οφείλεται πλέον στις ανθοκυάνες όπως στους νέους, αλλά αποκλειστικά στις ταννίνες ή σε ενώσεις ανθοκυανών – ταννινών

(Σουφλερός, 2012). Σχετικά με το ρόλο που παίζουν ανθοκυάνες και ταννίνες στο χρώμα των ερυθρών οίνων, πειράματα που έγιναν με συνθετικά διαλύματα έδειξαν ότι:

1. Οι ανθοκυάνες μόνες τους δεν δίνουν χρώμα όμοιο με εκείνο των ερυθρών οίνων. Το χρώμα αυτό όμως επιτυγχάνεται σε μίγμα ανθοκυανών και ταννινών.
2. Παρουσία αέρα, οι ταννίνες υφίστανται μια οξειδωτική μεταβολή, η οποία επιτυγχάνεται με την παρουσία ιόντων Fe^{+++} . Η μεταβολή αυτή οδηγεί σε ένα χρωματισμό, που είναι συνδυασμός των αποχρώσεων φαιού (καφέ), πορτοκαλί και κεραμιδί και θυμίζει το χρώμα των παλαιών οίνων.
3. Σε συνθήκες απόλυτα όμοιες με τις παραπάνω, οι ανθοκυάνες σε καθαρό διάλυμα μεταβάλλονται λίγο. Αντίθετα, οι ουσίες αυτές – σε μίγμα με τις ταννίνες – εξαφανίζονται γρήγορα και ο χρωματισμός που προκύπτει διαφέρει πολύ λίγο από τον χρωματισμό διαλύματος ταννίνης. Με τον τρόπο αυτό αποδεικνύεται η ύπαρξη αντίδρασης ανάμεσα στις δύο αυτές χρωστικές και επιβεβαιώνεται η σπουδαιότητα του ρόλου των ταννινών σε σχέση με τις ανθοκυάνες.

Σχετικά με την περιγραφή των μηχανισμών, με τους οποίους εξηγούνται τα παραπάνω φαινόμενα, η έρευνα έδειξε ότι, οι ανθοκυάνες αποχρωματίζονται λόγω μείωσης της οξύτητας, προσθήκης θειώδους ανυδρίτη ή αναγωγής. Σε μερικές περιπτώσεις τα φαινόμενα αυτά είναι αμφίδρομα. Επίσης έδειξε ότι, πολυάριθμες μεταβολές προκαλούν ανεπανόρθωτη καταστροφή των ανθοκυανών. Επιπροσθέτως, διάφορες αντιδράσεις συμπύκνωσης των μορίων των φλαβανών οδηγούν στις προανθοκυανιδίνες (διμερή ή τριμερή) και στις φλαβολάνες (ολιγομερή), που συνιστούν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι μεταβολές αυτές οδηγούν στο χρωματισμό των ταννινών και είναι υπεύθυνες για το καφέ-κεραμιδί χρώμα των παλαιών οίνων. Παρεμβαίνουν, επίσης, στους οργανοληπτικούς χαρακτήρες των παλαιωμένων οίνων καθώς και στα ιζήματα των ερυθρών χρωστικών. Τέλος, η εξαφάνιση των ανθοκυανών παρουσία ταννινών μπορεί να ερμηνευτεί με την αντίδραση συμπύκνωσης που έχει ως αποτέλεσμα να χάνονται οι ιδιότητες των ανθοκυανών, χωρίς ωστόσο να καταστρέφεται το μόριο τους (Σουφλερός, 2012).

1.5.2 Καθίζηση των έγχρωμων ενώσεων σε παλαιωμένους οίνους

Μια μακρά περίοδος παλαίωσης σε φιάλη περιλαμβάνει διάφορες αντιδράσεις οι οποίες συνεχίζονται μέχρι την ολοκλήρωση της εξέλιξης του οίνου. Οι αντιδράσεις αυτές προκαλούν πολυμερισμό των ταννινών και των ανθοκυανών. Είναι επίσης πιθανό να σχηματιστούν μικκύλια τα οποία γίνονται υδρόφοβα και καθιζάνουν, ακόμα και αν οι πολυμερισμένες ταννίνες έχουν μέγεθος μικρότερο από 100 Å. Αυτά τα ασταθή κολλοειδή παρατίθενται σε στοιβάδες, οι οποίες περιβάλλουν τα πλευρικά τοιχώματα των φιαλών. Δοκιμές διαλυτοποίησης των μορίων αυτών έδειξαν πως είναι πολύ διαφορετικά από τις κολλοειδείς χρωστικές, καθώς το φορμικό οξύ σε ανάμιξη με τη μεθανόλη είναι ο μόνος ικανός συνδυασμός για να διαλυθεί ένα μικρό τμήμα των αποθέσεων αυτών. Εκτός από τις ταννίνες και τις ανθοκυάνες, κάλιο και σίδηρος είναι παρόντα, όπως και νιτρικά, και σε ορισμένες περιπτώσεις μικρές ποσότητες πολυσακχαριτών. Υπό παρόμοιες συνθήκες θερμοκρασίας, αυτές οι καθιζήσεις εξελίσσονται με διάφορες ταχύτητες στους διάφορους οίνους. Οι οίνοι εξαιρετικής ποιότητας εξελίσσονται πιο αργά από τους μέτριους οίνους, ακόμα και αυτοί που έχουν παρόμοιο φαινολικό περιεχόμενο. Στην πρώτη περίπτωση, η κατακρήμνιση πραγματοποιείται μετά από περίπου είκοσι χρόνια, ενώ στη δεύτερη μπορεί να συμβεί μετά από την παραμονή λίγων ετών στη φιάλη. Η συγκεκριμένη φαινολική

σύσταση των εξαιρετικών οίνων εξακολουθεί να επηρεάζει το χαρακτήρα τους και την εξέλιξή τους κατά την διαδικασία της παλαίωσης (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

1.6 Άλλες ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων

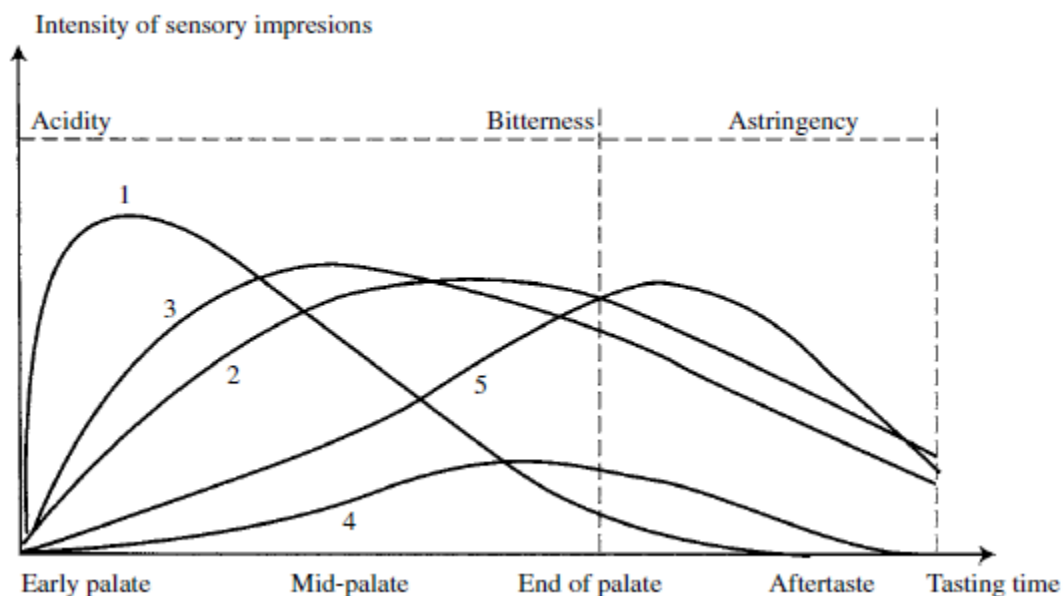
1.6.1 Οργανοληπτικές ιδιότητες στους ερυθρούς οίνους

Οι φαινολικές ενώσεις διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη γεύση των ερυθρών οίνων. Αυτές είναι υπεύθυνες για ορισμένα θετικά γευστικά χαρακτηριστικά, αλλά και για ορισμένα αρνητικά και μάλλον δυσάρεστα. Το σώμα, η επίγευση, η δομή, η πληρότητα και η στρογγυλάδα είναι όλες οργανοληπτικές ιδιότητες χαρακτηριστικές των μεγάλων ερυθρών οίνων. Από την άλλη πλευρά, πικράδα, τραχύτητα, σκληρότητα, δριμύτητα και λεπτότητα είναι σφάλματα που πρέπει να αποφεύγονται, δεδομένου ότι είναι ασυμβίβαστα με την ποιότητα. Η συνολική οργανοληπτική εντύπωση βασίζεται σε μια αρμονική ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο τύπων των αισθήσεων, που σχετίζονται άμεσα με τον τύπο και τη συγκέντρωση των διαφόρων μορίων, όπως ανθοκυάνες, και ιδιαίτερα ταννίνες. Μία από τις ιδιότητές τους είναι να αντιδρούν με γλυκοπρωτεΐνες στο σάλιο (βλέννας) και τις πρωτεΐνες του τοιχώματος της στοματικής κοιλότητας, τροποποιώντας την κατάσταση και τις λιπαντικές ιδιότητές τους. Μια μελέτη της αντίδρασης της προκυανιδίνης B3 με συνθετικές, πλούσιες σε προλίνη πρωτεΐνες έδειξε ότι τρία διμερή ήταν έντονα συνδεδεμένα με πρωτεϊνικές αλυσίδες (Simon et al., 2003). Σύμφωνα με τον τύπο και τη συγκέντρωση των ταννινών, μπορεί να παράγει μια μαλακή, ισορροπημένη εντύπωση ή αντίθετα, μια ορισμένη επιθετικότητα που είναι είτε αισθητή ως πικράδα στο τέλος του ουρανίσκου ή στυφάδα στην επίγευση. Αντικειμενικές μετρήσεις αυτών των βασικών οργανοληπτικών χαρακτήρων είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο και δύσκολο να πραγματοποιηθούν. Ωστόσο, ο δείκτης ζελατίνης παρέχει μια εκτίμηση της δραστηριότητας με πρωτεΐνες. Η ένταση της αντίδρασης πολυφαινόλης-ζελατίνης εξαρτάται από τις συνθήκες. Η οξύτητα είναι ένας ευνοϊκός παράγοντας, σε αντίθεση με την περιεκτικότητα σε αλκοόλη, η οποία αναστέλλει την αντίδραση και δίνει μια γλυκιά γεύση. Η αντίδραση είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση των ταννινών σε τιμές άνω των 50 mg/L (Glories, 1983). Σύμφωνα με τον Lea (1992), η αντίδραση μεταξύ ταννινών και πρωτεϊνών εξαρτάται από τον βαθμό πολυμερισμού των προκυανιδινών. Η στυφάδα αυξάνεται μέχρι επταμερή σύμπλοκα και στη συνέχεια μειώνεται, καθώς τα μόρια είναι πολύ ογκώδη. Μέγιστη πικράδα παρουσιάζεται με τετραμερείς προκυανιδίνες. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τον Mirabel (2000) και δείχνουν ότι η διαφορά μεταξύ πικράδας και στυφάδας διέφεραν σημαντικά από τον ένα δοκιμαστή στον άλλο και ότι η διάκριση αυτή δεν ήταν σαφής. Οι Glories και Augustin (1994) απομόνωσαν τρία κλάσματα προκυανιδινών από σταφύλια, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Nagel και Glories (1991), καθώς και ανθοκυάνες από τους φλοιούς και ταννίνες από τους βόστρυχες. Από τη δοκιμή των πέντε εκχυλισμάτων προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα (Εικόνα 13):

1. Οι σχετικά ολιγομερείς - προκυανιδίνες (διμερή, τριμερή, κλπ) αντιδρούν λιγότερο με τις πρωτεΐνες. Το διάλυμα που τις περιείχε αξιολογήθηκε περισσότερο ως όξινο παρά στυφό.
2. Οι πολυμερείς προκυανιδίνες δίνουν μια εντύπωση σώματος, με έντονη πικράδα και στυπτικότητα. Ο ετερογενής πολυμερισμός παράγει δομικές τροποποιήσεις που μειώνουν τη

δραστικότητα τους (δείκτης ζελατίνης). Η στυπτικότητα των συμπυκνωμένων ταννινών του οίνου, που αποτελείται από προκυανιδίνες, μειώνεται με τον πολυμερισμό. Σύμπλοκα ταννινών και πολυσακχαριτών δίνουν την εντύπωση της πληρότητας και στρογγυλότητας που είναι ιδιαίτερα επιθυμητή. Οι ανθοκυάνες και οι ενώσεις τους με τις ταννίνες δεν παρουσιάζουν σημαντική στυπτικότητα, αλλά πικράδα, ειδικά σε νεαρά κρασιά, δηλαδή όταν οι μοριακές δομές είναι σαφώς καθορισμένες και δεν είναι ιδιαίτερα περίπλοκες.

3. Οι ταννίνες που εξάγονται από τους φλοιούς αντιδρούν λιγότερο με τις πρωτεΐνες σε σχέση με εκείνες των γιγάρτων και βοστρύχων. Η ταννική ισορροπία ενός νεαρού ερυθρού οίνου προέρχεται από μια καλή εναρμόνιση των ταννινών και των δύο προελεύσεων. Οι ταννίνες των γιγάρτων συμβάλλουν στη δομή του οίνου και το σώμα, ενώ οι ταννίνες των φλοιών παρέχουν πληρότητα, στρογγυλάδα και χρώμα. Ωστόσο, υπάρχει μεγάλος κίνδυνος από την υπερβολική στυπτικότητα αν οι ταννίνες των γιγάρτων κυριαρχούν. Η πικράδα και ένας φυτικός χαρακτήρας είναι τυπικό αποτέλεσμα των ταννινών που προέρχονται από τους φλοιούς, ειδικά αν τα σταφύλια δεν είναι αρκετά ώριμα. Είναι χρήσιμο να μετρηθεί η περιεκτικότητα των ταννινών στο κρασί, αλλά αυτός δεν είναι ο μόνος παράγοντας που εμπλέκεται στην εκτίμηση της στυφάδας. Άλλα συστατικά, όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, αιθανόλη, γλυκερίνη και τρυγικό οξύ, είτε αναστέλλουν την αντίδραση και μετριάζουν την επιθετικότητα τους ή την επιδεινώνουν.



Εικόνα 13. Επίδραση της δομής των φαινολικών ενώσεων στην ποικιλία των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους: (1), προκυανιδίνες, μερικές πολυμερισμένες προκυανιδίνες (2), ολιγομερείς προκυανιδίνες (3), πολυμερισμένες προκυανιδίνες (4), ανθοκυάνες (5), ταννίνες από βόστρυχες. (Glories, 1994)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΠΑΛΑΙΩΣΗ

2.1 Αντιδράσεις κατά την παλαίωση σε βαρέλι και σε φιάλη

Κατά την παλαίωση χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή σε παράγοντες όπως η οξείδωση, η θερμοκρασία, ο χρόνος και η διαύγαση. Η οξείδωση προάγεται με τον αερισμό του οίνου, ο οποίος πραγματοποιείται κατά την παλαίωση σε βαρέλι, την ανάδευση και την ελεγχόμενη εισαγωγή οξυγόνου. Άλλος παράγοντας που βοηθά στην οξυγόνωση είναι η παρουσία καταλυτών από το ξύλο, των ελλαγιταννινών. Η οξείδωση είναι επιθυμητή αφού ενισχύει και σταθεροποιεί το χρώμα, ενώ μαλακώνει τη γεύση, θα πρέπει όμως να γίνεται ελεγχόμενα, διαφορετικά μπορεί να προκαλέσει μη αντιστρέψιμη υποβάθμιση του οίνου. Μια υπερβολική οξυγόνωση μπορεί να οδηγήσει είτε σε οξειδωτική διάσπαση των ανθοκυανών, είτε σε μερική σταθεροποίηση των ανθοκυανών με το σχηματισμό μωβ συμπλόκων με αιθυλικούς σταυροδεσμούς, είτε σε παραγωγή πορτοκαλόχρωμων συστατικών με προσθήκη ακεταλδεΐδης, είτε τέλος, σε οξείδωση του τρυγικού οξέος προς σχηματισμό κίτρινου ξανθιλίου (Guerra and Glories, 1996). Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν εξαρτώνται από τις σχετικές συγκεντρώσεις των ταννινών και των ανθοκυανών, αλλά και από το είδος των ταννινών. Η θερμοκρασία είναι επίσης σημαντικός παράγοντας. Χαμηλές θερμοκρασίες οδηγούν στην καθίζηση των ασταθών κολλοειδών. Αντίθετα, θερμοκρασίες πάνω από τους 20 °C προάγουν τον σχηματισμό καρβοκατιόντων από τις προκυανιδίνες, οπότε και το σχηματισμό συμπλόκων ΤΑ, με χρώμα κόκκινο και πορτοκαλί, όπως και ο ομοιογενής πολυμερισμός. Ακόμα, οι υψηλές θερμοκρασίες διευκολύνουν το συνδυασμό με πολυσακχαρίτες, αλλά και τις αντιδράσεις διάσπασης του χρώματος. Επιπλέον, προάγεται η θερμική υποβάθμιση ορισμένων ανθοκυανών, κυρίως της μαλβιδίνης. Η διάρκεια της παλαίωσης σε βαρέλι που απαιτείται για να παραχθεί οίνος με την επιθυμητή ποιότητα εξαρτάται από τον τύπο του οίνου και τις απαραίτητες τροποποιήσεις που γίνονται. Ένας οίνος με ισορροπημένη ταννική δομή, που έχει ήδη διαμορφωθεί σωστά, είναι πιθανό να «στεγνώσει» σε περίπτωση παρατεταμένης παλαίωσης. Αντίθετα, ένας οίνος με υψηλή συγκέντρωση φαινολικών συστατικών απαιτεί μακροχρόνια παλαίωση προκειμένου να μαλακώσουν οι ταννίνες. Σε πολλά ευρωπαϊκά οινοποιεία, όπου εκχυλίζονται μεγάλες ποσότητες ταννινών κατά την οινοποίηση, οι οίνοι είναι θολοί, αδιαύγαστοι και επιθετικοί, οπότε απαιτείται πολυετής παλαίωση προκειμένου να γίνει διαύγαση. Αυτή είναι η μόνη περίπτωση όπου η καθίζηση των πολυμερισμένων ταννινών κάνει τον οίνο πιο μαλακό. Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης σε αεροστεγή φιάλη, ο οίνος αποτελεί υπόστρωμα ελαφράς οξείδωσης. Στην περίπτωση αυτή επηρεάζεται κυρίως από αντιδράσεις μετατροπής που είναι ανεξάρτητες από το οξυγόνο. Πρόκειται για αντιδράσεις που αφορούν καρβοκατιόντα που σχηματίστηκαν από προκυανιδίνες, συμπύκνωση ανθοκυανών και πολυμερισμό ομοιογενών ταννινών. Θερμοκρασίες που είναι σχετικά υψηλές προάγουν αυτές τις αντιδράσεις και επιταχύνουν την παλαίωση. Σχετικά με τις αλλαγές του χρώματος είναι σημαντικό πως τα μωβ σύμπλοκα που σχηματίστηκαν με αιθυλοδεσμούς μετατρέπονται σε πορτοκαλί πυρανοβινυλοπροκυανιδίνες. Η παρουσία των πολυσακχαριτών παρεμποδίζει την εξέλιξη της αντίδρασης, η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Έτσι εξηγείται η διαφορά μεταξύ οίνων εξαιρετικής ποιότητας, οι οποίοι παραμένουν κόκκινοι για πολλά χρόνια και οίνων μέτριας ποιότητας, οι οποίοι γρήγορα αποκτούν μια κίτρινη χροιά, όπως οι οίνοι που έχουν κορεστεί από οξυγόνο κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Μερικά χρόνια μετά την εμφιάλωση (1 έως 3), παρατηρείται μια αλλαγή στη γεύση σε ορισμένους οίνους, ιδιαίτερα στον ταννικό χαρακτήρα τους. Οι οίνοι αυτοί φαίνονται παροδικά αδύναμοι, με λιγότερο σώμα, ενώ το

χρώμα τους παραμένει έντονο και όχι ιδιαίτερα εξελιγμένο. Αναλύσεις έχουν δείξει πως υπάρχει μια αναδιάταξη στη δομή των ταννινών, σε μη οξειδωτικό μέσο, η οποία οδηγεί σε αποπολυμερισμό, κάτι που διαπιστώνεται με αλλαγές στο αποτέλεσμα της μέτρησης των ταννινών και μείωση του δείκτη υδροχλωρίου που δείχνει τον βαθμό πολυμερισμού. Κάποια μέρη των ετερογενών πολυμερών ενδέχεται να καταστραφούν, πριν την πραγματοποίηση του ακόλουθου ομοιογενούς πολυμερισμού. Αυτό είναι χαρακτηριστικό των οίνων υψηλής ποιότητας, στους οποίους σχηματίζεται μια μεγάλη ποικιλία ταννινών κατά την παλαίωση. Οι αντιδράσεις αυτές επιβραδύνουν την εξέλιξη του οίνου και του προσδίδουν μια πολυπλοκότητα, όσον αφορά τη γεύση και το άρωμα. Αυτή η πολύπλοκη χημεία των ταννινών δεν πραγματοποιείται κατά την εξέλιξη των μέτριων οίνων, οι οποίοι διαμορφώνουν συνεχώς και με μεγάλο ρυθμό έναν ώριμο χαρακτήρα (Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Matejicec, et al., 2005, Makris, et al., 2006(a), Kallithraka, et al., 2009).

2.2 Η επίδραση του δρύινου βαρελιού στις φαινολικές ουσίες των οίνων

Το κυριότερο φαινόμενο που παρατηρείται κατά την παραμονή του οίνου στο βαρέλι είναι η μικροοξυγόνωση. Η σταδιακή και μικρή διάλυση οξυγόνου στον όγκο του οίνου γίνεται διαμέσου των πόρων του βαρελιού, ανάλογα με το βοτανικό είδος από το οποίο προέρχεται. Η *Quercus sessiflora* είναι δρυς αργής ανάπτυξης και αποτελείται από πόρους μικρότερης διαμέτρου. Η *Quercus pedunculata* επιτρέπει μεγαλύτερη οξυγόνωση, αφού είναι δρυς γρήγορης ανάπτυξης με πολυπληθείς και μεγάλους πόρους, εξελίσσοντας έτσι γρηγορότερα τον οίνο. Βαρέλια που παράγονται από το είδος αυτό χρησιμοποιούνται κυρίως για παλαίωση αποσταγμάτων στεμφύλων (Marc, Grappa κτλ) ή οίνων (Cognac, Armagnac). Έχουμε προαναφέρει ότι η μικροοξυγόνωση έχει άμεση σχέση με την εξέλιξη (ωρίμαση, παλαίωση) του οίνου, αφού ανεβάζει το δυναμικό οξειδοαναγωγής. Παράλληλα, έχει άμεση επίδραση πάνω στα πολυφαινολικά συστατικά, αφού το οξυγόνο παίζει το ρόλο του καταλύτη στις αντιδράσεις ανθοκυανών (χρωστικές)–ταννινών (στυφές ουσίες), με αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερού και συμπαγούς χρώματος των ερυθρών οίνων κατά τη διάρκεια του χρόνου. Επιπλέον, το οξυγόνο παίζει καταλυτικό ρόλο για τον πολυμερισμό των ταννινών, με αποτέλεσμα τη μείωση της ανεπιθύμητης στυφάδας, κάνοντας τον οίνο μαλακότερο (Γεωργίου, 2005).

2.3 Μεταβολές στις ταννίνες που μαλακώνουν τον οίνο

Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης των ερυθρών οίνων, τόσο πριν όσο και μετά την εμφιάλωση, οι ταννίνες υφίστανται μετασχηματισμούς που δεν είναι μόνο εν μέρει υπεύθυνοι για τις αλλαγές στο χρώμα, αλλά ταυτόχρονα συνοδεύονται από μείωση της στυπτικότητας. Συμβαίνουν πολλές αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων και οξειδωτικών φαινομένων:

1. Σε ένα όξινο μέσο, οι προκυανιδίνες, παράγουν καρβοκατιόντα. Αυτά δημιουργούν σύμπλοκα με φλαβανόλες, μια αντίδραση που ευνοείται από υψηλές θερμοκρασίες, και οδηγεί στην δημιουργία πολυμερών. Αυτό τροποποιεί τόσο τη δομή όσο και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των μορίων των ταννινών. Ο βαθμός πολυμερισμού (που εκφράζεται από τον δείκτη HCl) αυξάνεται σε υψηλές θερμοκρασίες (Εικόνα 14), ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η καταβύθισή τους με ζελατίνη σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Οι

αλλαγές αυτές οδηγούν στο μαλάκωμα του οίνου. Καταβύθιση παρουσιάζεται όταν τα μόρια γίνονται πολύ ογκώδη για να παραμείνουν διαλυμένα.

2. Η αιθανόλη είναι υπεύθυνη και για άλλες αντιδράσεις πολυμερισμού που λαμβάνουν χώρα με την παρουσία οξυγόνου, ή σε ένα οξειδωτικό μέσο, και παράγουν πολύπλοκες δομές (Saucier et al., 1997) γνωστές ως «ετερογενή» πολυμερή. Αν και οι τιμές του δείκτη HCl αυξάνονται περισσότερο με την απουσία αέρα, τα ετερογενή πολυμερή αντιδρούν λιγότερο με τη ζελατίνη συγκρινόμενα με τα ομοιογενή μόρια. Μπορεί να συμβεί καταβύθιση, ανάλογα με την ποσότητα της αιθανόλης και τον τύπο των προκυανιδινών (ολιγομερών ή πολυμερών) στο μέσο. Είναι επομένως προφανές ότι ο τρόπος που ένα κρασί αποθηκεύεται, είτε σε αεροστεγείς δεξαμενές ή με την παρουσία οξυγόνου, έχει άμεση επίδραση στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η παλαίωση στο μπουκάλι δεν είναι σε θέση να μειώσει την στυφάδα του οίνου σε μεγάλο βαθμό: ένα αρχικά επιθετικό κρασί θα διατηρεί πάντα αυτόν τον χαρακτήρα. Υπάρχει επίσης ένας κίνδυνος απώλειας σώματος λόγω καταβύθισης.

3. Οι ταννίνες μπορεί να εμπλέκονται και σε άλλες αντιδράσεις που περιλαμβάνουν πολυμερή μόρια, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες σταφυλιών ή μικροοργανισμών. Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται όταν οι ταννίνες αντιδρούν με ογκώδη πολυμερή παρουσιάζουν κολλοειδή μορφή. Υπάρχει πιθανότητα καταβύθισης τους κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, όταν μειώνεται η κίνηση Brown λόγω χαμηλών θερμοκρασιών. Όταν συμμετέχουν μικρότεροι πολυσακχαρίτες, η καθίζηση είναι λιγότερο έντονη, αλλά η σταθερότητα των συμπλόκων εξακολουθεί να εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η θέρμανση διευκολύνει την συμπύκνωση και την ένωση μεταξύ των συμπλόκων, δηλαδή το σχηματισμό κολλοειδών (Ribereau-Gayón et al., 1966), τα οποία με τη σειρά τους, μπορούν να καθιζάνουν. Αυτά τα σύμπλοκα βελτιώνουν τη γεύση ενός κρασιού και οφείλεται στο γεγονός ότι οι ταννίνες αντιδρούν λιγότερο με τις πρωτεΐνες του σιέλου και ταυτόχρονα συμμετέχουν στο σώμα του οίνου. Η παραπάνω τεχνική χρησιμοποιείται συνήθως για τους λευκούς οίνους αλλά μπορεί να εφαρμοστεί και για ερυθρούς οίνους. Τα αποτελέσματα εξαρτώνται από την ποικιλία του σταφυλιού, το χρόνο επαφής και το έτος συγκομιδής. Υπάρχει όμως ο κίνδυνος αυτή η διαδικασία να οδηγήσει σε απώλεια ταννινών, η οποία είναι πιθανό να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα του οίνου ιδιαίτερα όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες.

Πίνακας 2. Αλλαγές στη σύνθεση των φαινολών σε ερυθρό οίνο (Merlot) μετά από 6 μήνες, σε σχέση με τον αερισμό και τη θερμοκρασία (Glories and Bondet de la Bernardie, 1990)

	<i>t</i> = 0	12°C		25°C	
	control	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Total phenols (OD 280)	47.5	50	49	52	50
Tannins (g/l)	2.68	2.97	2.76	3.19	2.82
HCl index	14.5	22.5	31	35	47.5
Dialysis index	13	15	20	22	32.5
Gelatine index	45	50	41	45	35
Anthocyanins (mg/l)	556	234	116	60	31
PVPP index	32	58	91	94	100

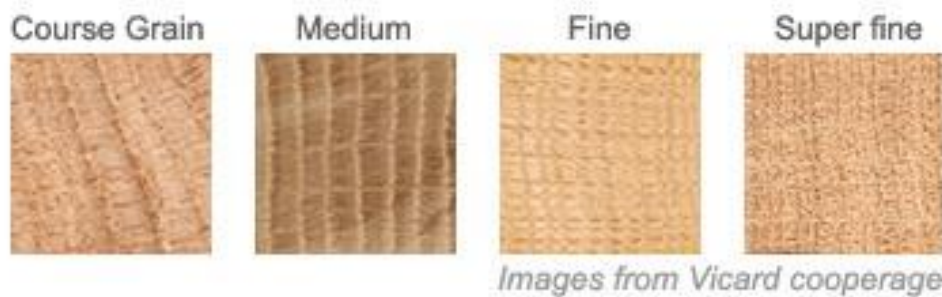
2.4 Αρωματικά συστατικά κατά τη διάρκεια της παλαίωσης

Το άρωμα ενός νέου οίνου οφείλεται στις αρωματικές ενώσεις που προέρχονται από το σταφύλι και πιο συγκεκριμένα από το φλοιό της ράγας και από τις διάφορες ζυμώσεις. Αντίθετα, ο παλιός οίνος χαρακτηρίζεται από το μπουκέτο (bouquet) ή ευωδία, που οφείλεται σε αρωματικά συστατικά που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης. Αποτελείται, κυρίως από διάφορα αιθέρια έλαια του σταφυλιού. Το μπουκέτο ή τριτεύον άρωμα χαρακτηρίζει αποκλειστικά παλαιούς οίνους και οφείλεται σε αρωματικές ενώσεις που σχηματίζονται κυρίως κατά τη διάρκεια της παλαίωσης με οξειδώσεις, αναγωγές, εστεροποιήσεις και άλλους μηχανισμούς. Με την παλαίωση του οίνου σε βαρέλια εμπλουτίζεται από γευστικά και αρωματικά συστατικά που προέρχονται από το ξύλο της δρυός. Τέτοια είναι οι ταννίνες, η βανιλίνη (βανιλική αλδεύδη), η συριγκαλδεύδη, τα οξέα βανιλικό, συριγγικό, φερουλικό κ.α. Οι ουσίες αυτές βελτιώνουν την γεύση και το μπουκέτο του οίνου (Σουφλερός, 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- ΞΥΛΟ

Η δρυς (βελανιδιά) είναι δένδρο που φτάνει τα 25-30 μέτρα σε ύψος, έχει διάρκεια ζωής άνω των 300 χρόνων και συνήθως κόβεται στα 180-250 έτη. Υπάρχουν πολλά είδη δρυός που είτε φύονται είτε καλλιεργούνται σε διάφορες περιοχές του κόσμου, δίνοντας ξύλο διαφορετικής ποιότητας. Οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες στη βαρελοποιία είναι γαλλικής προέλευσης, αλλά και από Πορτογαλία, Τσεχοσλοβακία, Πολωνία, Ουγγαρία, Αυστρία, Γιουγκοσλαβία, Η.Π.Α., Ρωσία κ.λπ. Από τα πολλά είδη, μόνο λίγα είναι κατάλληλα για την κατασκευή βαρελιών (Τσακίρης, 1998). Τα είδη δρυός που χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή βαρελιών αμερικάνικης δρυός είναι το *Quercus alba*, το οποίο είναι λευκή δρυς που χαρακτηρίζεται από σχετικά γρήγορη ανάπτυξη, πλατείς ιστούς και χαμηλή συγκέντρωση ταννινών στο ξύλο. Εντοπίζεται κυρίως στις περισσότερες ανατολικές ΗΠΑ από όπου προέρχονται πολλά βαρέλια, ενώ στο Oregon η λευκή δρυς *Quercus garryana* έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται εξαιτίας των ομοιοτήτων της

με την ευρωπαϊκή δρυ. Στη Γαλλία, τόσο η *Quercus robur* (κοινή δρυς) όσο και η *Quercus petraea* (άμισχη δρυς) θεωρούνται κατάλληλες για οινοποίηση, ωστόσο η δεύτερη θεωρείται μακράν ανώτερη για τη λεπτότερη υφή της και την πλουσιότερη συνεισφορά της σε αρωματικά συστατικά όπως η βανιλίνη και τα παράγωγά της, και η μεθυλ-οκταλακτόνη, αλλά και σε ταννίνες, φαινόλες και πτητικές αλδεϋδες. Η γαλλική δρυς προέρχεται από ένα ή περισσότερα δάση που βρίσκονται σε περιοχές της Γαλλίας και το ξύλο καθενός από αυτά τα δάση εμφανίζει ελαφρώς διαφορετικά χαρακτηριστικά. Πολλοί οινοποιοί χρησιμοποιούν βαρέλια κατασκευασμένα από διαφορετικά βαρελοποιεία, περιοχές και βαθμό κανίματος στην ανάμιξη των οίνων τους για να ενισχύσουν την πολυπλοκότητα του παραγόμενου οίνου (Stevenson, 2005). Διαφορές στην υφή του ξύλου στα διάφορα είδη γαλλικής δρυός φαίνονται στην εικόνα 14. Όσο αυξάνεται η ηλικία του δένδρου τόσο η υφή γίνεται πιο σκληρή και συμπαγής.



Εικόνα 14. Διαφορές στην υφή του ξύλου στα διάφορα είδη γαλλικής δρυός. Όσο αυξάνεται η ηλικία του δένδρου τόσο η υφή γίνεται πιο σκληρή και συμπαγής.

Στην Ιταλία χρησιμοποιούν σλοβένικη δρυ του είδους *Quercus robur*, το οποίο είναι γνωστό για την σφιχτή του υφή, τη χαμηλή συγκέντρωση αρωματικών και τις ταννίνες μεσαίου επιπέδου. Η σλοβένικη δρυς τείνει να χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερου μεγέθους βαρέλια (με μικρότερη επιφάνεια σε σχέση με τον όγκο), με τα ίδια βαρέλια να επαναχρησιμοποιούνται για πολλά περισσότερα χρόνια πριν την αντικατάστασή τους. Κατά τη διάρκεια των ετών έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα είδη ξύλου στην κατασκευή μεγάλων δεξαμενών οινοποίησης, συμπεριλαμβανομένης της καστανιάς, του πεύκου, της σεκόγιας και της ακακίας, ωστόσο κανένα από αυτά δεν παρουσιάζει την συμβατότητα με τον οίνο που επιδεικνύει η δρυς, συνδυάζοντας τη δυνατότητα αποθήκευσης και στεγανότητας, αν και ελαφρώς πορώδης, με τα μοναδικά χαρακτηριστικά αρώματος γεύσης και υφής που προσδίδει στον οίνο με τον οποίο έρχεται σε επαφή. Η καστανιά χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε ταννίνες και είναι πάρα πολύ πορώδης και πρέπει να επικαλυφθεί με παραφίνη για να αποτραπεί η υπερβολική απώλεια οίνου μέσω της εξάτμισης. Η σεκόγια είναι πάρα πολύ άκαμπτη ώστε να λυγίσει σε μικρότερου σχήματος βαρέλια και προσδίδει ένα δυσάρεστο άρωμα. Η ακακία προσδίδει μία κίτρινη απόχρωση στον οίνο, χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις βανιλίνης, ενώ άλλα σκληρά ξύλα όπως η μηλιά και η κερασιά έχουν μία απωθητική οσμή. Βαρέλια από ακακία χρησιμοποιούνται από οινοποιούς στην Αυστρία, ενώ ιστορικά, η καστανιά χρησιμοποιήθηκε από Ιταλούς και Πορτογάλους οινοποιούς (Robinson, 2003, 2006). Γενικά, σε ορεινές βόρειες περιοχές παρατηρείται πιο κανονική αύξηση και μικροί πόροι,

κατάλληλοι για παλαίωση οίνων που έχουν ανάγκη μικρότερης οξυγόνωσης, ενώ οι δρύες των παραθαλάσσιων, θερμών περιοχών είναι πιο πορώδεις και πιο δύσκολες στην κατεργασία τους, καταλληλότερες για αποστάγματα. Η γεωγραφική προέλευση της περιοχής από όπου προέρχεται το ξύλο κάθε βαρελιού είναι πολύ δύσκολο να γίνει αντιληπτή, αφού η ξυλεία προέρχεται από διαφορετικά δέντρα και συνεπώς τα βαρέλια διαφέρουν μεταξύ τους. Ο ίδιος οίνος διαφοροποιείται ποιοτικά ωριμάζοντας σε διαφορετικά βαρέλια. Έτσι, δίνεται μεγάλη σημασία τόσο στην χώρα, όσο και στην περιοχή από την οποία προέρχεται το ξύλο, διότι τα ίδια είδη αναπτυσσόμενα σε διαφορετικές κλιματικές, γεωλογικές και γεωγραφικές συνθήκες παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης και δίνουν κορμούς με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, ακόμη και δέντρα από τον ίδιο τόπο (Τσακίρης, 1998).

3.1 Βαθμός καψίματος

Το κάψιμο αποτελεί μία διαδικασία που επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην δομή και την σύσταση των συστατικών του ξύλου. Η ποιότητα των βαρελιών εξαρτάται από το επιτυχές κάψιμο. Ενώ ο βαθμός καψίματος (Εικόνα 15) ασκεί σημαντική επίδραση στην ωρίμαση του οίνου κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, καθώς επίσης και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που πρόκειται να αποκτήσει.



Εικόνα 15. Στην διπλανή εικόνα φαίνεται η όψη του ξύλου έπειτα από τα διαφορετικά είδη καψίματος.

Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες καψίματος, με βάση την θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται το κάψιμο και το χρονικό διάστημα για το οποίο την δέχεται.

Ελαφρύ κάψιμο (Light toast)

Αντιστοιχεί σε χρόνο καψίματος περίπου 5 min, ενώ η θερμοκρασία της εσωτερικής επιφάνειας του βαρελιού φτάνει τους 120-180 °C. Το εσωτερικό του βαρελιού αποκτά σπογγώδη υφή, λόγω τροποποίησης των λιγνινών και των ημικυτταρινών, ενώ η δομή κυτταρίνης παραμένει άθικτη. Το κάψιμο αυτό βοηθά την ενίσχυση των αρωμάτων των φρούτων.

Μεσαίο κάψιμο (Medium toast) (1)

Το ξύλο δρυός δέχεται θερμοκρασίες της τάξης των 200 °C για περίπου 10 min. Η δομή των πολυμερών σωμάτων της επιφάνειας μεταβάλλεται από την τήξη. Η επίδραση των συνθηκών αυτών έχει σαν αποτέλεσμα ένα ξύλο που θα δώσει έναν έντονο αρωματικό συνδυασμό με κυρίαρχο το άρωμα των φρούτων.

Μεσαίο κάψιμο (Medium toast) (2)

Αντιστοιχεί σε χρόνο καψίματος 15 min περίπου, με την θερμοκρασία της εσωτερικής επιφάνειας να φτάνει τους 200 °C. Ο βαθμός αυτός καψίματος αφήνει στον οίνο αρώματα ώριμων φρούτων μαζί με κάποιες νότες καπνιστού.

Έντονο κάψιμο (Heavy toast)

Σε αυτόν τον βαθμό καψίματος η θερμοκρασία της εσωτερικής επιφάνειας ξεπερνά τους 230 °C, για χρόνους που ξεπερνούν τα 15 min. Η δομή κυττάρων της εσωτερικής επιφάνειας αποδιοργανώνεται σε σημαντικό βαθμό, ενώ σχηματίζονται φουσκάλες και μικροσκοπικές ρωγμές. Ο οίνος που προέρχεται από αυτό το βαρέλι έχει αρώματα στα οποία κυριαρχούν τα μπαχαρικά.

3.2 Υποπροϊόντα δρυός

Η χρήση φθηνών εναλλακτικών προϊόντων δρυός έχει αρχίσει να γίνεται δημοφιλής στα κρασιά του νέου κόσμου και στα αποστάγματα. Η απλούστερη μέθοδος δρύινης παλαίωσης είναι με τη χρήση chips δρυός (Εικόνα 16). Πολλά είδη chips είναι διαθέσιμα στο εμπόριο και διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος, την προέλευση και την επεξεργασία που έχουν υποστεί (βαθμός καψίματος). Άλλα εναλλακτικά προϊόντα δρυός περιλαμβάνουν διάφορα συστήματα από μετακινούμενες δούγκες (Εικόνα 16) που αντικαθίστανται αφού εξαντληθούν τα συστατικά τους. Αυτά τα συστήματα χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με αδρανείς δεξαμενές ή με παλιά δρύινα βαρέλια. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται κυρίως εκτός Ευρώπης στην οποία έχουν αρχίσει να εφαρμόζονται τα τελευταία χρόνια. Ένα άλλο εναλλακτικό προϊόν προέρχεται από εκχυλίσματα ξύλου δρυός, των οποίων η χρήση περιορίζεται στην παρασκευή brandy. Επιτρέπονται στην παρασκευή Armagnac και cognac και πρέπει να προέρχονται από την εκχύλιση δρύινων chips με τη χρήση βραστού νερού και για αυτό στερούνται πτητικών συστατικών, και αποτελούνται κυρίως από πολυφαινόλες

δρυός και τα υποβαθμισμένα προϊόντα αυτών. Πιο εξειδικευμένα παρασκευάσματα είναι διαθέσιμες σαν υγρό ή λυοφιλιωμένη σκόνη που παράγονται από εκχύλιση ξύλου δρυός που προηγουμένως είχε υποστεί φυσικές ή χημικές διεργασίες.

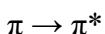
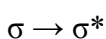


Εικόνα 16. Αριστερά δούγες δρυός διαφορετικού καψίματος. Δεξιά chips δρυός

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- Μέθοδοι προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων

4.1 Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού

Η απορρόφηση της υπεριώδους και ορατής ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ουσίας οφείλεται σε ηλεκτρονικές διεγέρσεις. Στις διεγέρσεις αυτές τα ηλεκτρόνια μεταπίπτουν σε διαφορετική ενεργειακή κατάσταση χωρίς να αλλάζουν ηλεκτρονική στοιβάδα. Οι κυριότερες διεγέρσεις ηλεκτρονίων που συμβαίνουν στα μόρια των οργανικών μορίων είναι:



Οι διεγέρσεις αυτές εμφανίζονται στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος. Στα μόρια, που έχουν εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα, παρατηρούνται μετατοπίσεις των παραπάνω διεγέρσεων στα μεγαλύτερα μήκη κύματος και πολλές φορές στην ορατή περιοχή του φάσματος. Η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας από τα διαλύματα των ανόργανων ενώσεων οφείλεται κυρίως σε διεγέρσεις μεταφοράς φορτίου. Αντίθετα η απορρόφηση της ορατής ακτινοβολίας οφείλεται σε διεγέρσεις των d και f ηλεκτρονίων των μεταβατικών στοιχείων. Οι άχρωμες οργανικές ή ανόργανες ενώσεις, που δεν απορροφούν στην ορατή περιοχή του φάσματος, μπορούν να μετατραπούν σε έγχρωμες, με κατάλληλες χημικές αντιδράσεις, (π.χ. οξείδωση, σχηματισμός συμπλοκών ενώσεων κτλ.). Οι ηλεκτρονικές διεγέρσεις συνοδεύονται από διεγέρσεις δόνησεως και περιστροφής των μορίων και από διάφορες επιδράσεις των μορίων του διαλύτη. Για το λόγο αυτό, τα μοριακά φάσματα

απορροφήσεως έχουν την μορφή ταινιών. Αντίθετα τα ατομικά φάσματα απορροφήσεως είναι γραμμωτά (Μπασσιούρας και Παπαθανασοπούλου, 2010).

4.2 Φάσματα απορροφήσεως υπεριώδους –ορατού

Η γραφική απεικόνιση της απορροφήσεως ενός διαλύματος σε σχέση με το μήκος κύματος της μονοχρωματικής δέσμης δίνει το φάσμα απορροφήσεως της διαλυμένης ουσίας. Η συγκέντρωση του διαλύματος και το πάχος της κυψελίδας εκλέγονται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι μετρήσεις της απορροφήσεως να έχουν τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια. Στην ποιοτική ανάλυση προτιμώνται οι καμπύλες \log_e , σε σχέση με το μήκος κύματος επειδή η μορφή των καμπύλων αυτών είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα φάσματα δίνονται και σαν μεταβολή της διαπερατότητας. Σε ορισμένα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης υπάρχει αυτόματη διάταξη καταγραφής της πρώτης ή της δεύτερης παραγώγου των φασμάτων απορρόφησης. Οι παράγωγοι των φασμάτων χρησιμοποιούνται τόσο στην ποιοτική, όσο και στην ποσοτική χημική ανάλυση. Το μήκος κύματος, στο οποίο παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό απορροφήσεως, ονομάζεται μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και συμβολίζεται με λ_{max} . Η θέση που βρίσκεται το μέγιστο απορροφήσεως εξαρτάται από το ηλεκτρονικό σύστημα της ουσίας που συμμετέχει στη διέγερση. Στο λ_{max} ο μοριακός συντελεστής αποσβέσεως έχει τη μέγιστη τιμή και συμβολίζεται με ϵ_{max} (Μπασσιούρας και Παπαθανασοπούλου, 2010).

4.3 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός

Οι φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί βασίζονται στο γνωστό νόμο του Beer. Τα δείγματα, στα οποία πρόκειται να γίνει ο προσδιορισμός ενός ή περισσοτέρων συστατικών, κατεργάζονται έτσι, ώστε στο τελικό στάδιο της κατεργασίας να έχουμε διάλυμα. Ο προσδιορισμός των συστατικών στο διάλυμα αυτό γίνεται, είτε με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων, ή με μία φασματοφωτομετρική ογκομέτρηση.

4.4 Ολικές φαινόλες

Ο οίνος περιέχει πολλά φαινολικά συστατικά σε ευρέως κυμαινόμενες ποσότητες. Η ιδανική μέθοδος για να εκτιμηθεί η περιεκτικότητα σε αυτά είναι να προσδιοριστούν όλα και στη συνέχεια να μετρηθεί το καθένα ξεχωριστά. Κάτι τέτοιο όμως δεν είναι εφικτό, λόγω της ποικιλομορφίας των μορίων, σε συνδυασμό με τη δυσκολία της ανάλυσης του συνόλου τους. Επιπλέον, ακόμα και οι πιο αποτελεσματικές τεχνικές συχνά είναι ιδιαίτερα δύσχρηστες στην εφαρμογή τους, ενώ τα αποτελέσματα είναι ελλιπή και δύσκολα στην ερμηνεία τους. Έτσι, αν και οι μέθοδοι αυτές είναι χρήσιμες για ερευνητικούς σκοπούς, στην πραγματικότητα δεν εφαρμόζονται κατά την οινοποίηση. Μια σφαιρική εκτίμηση του φαινολικού περιεχομένου του οίνου, εκφρασμένη με νούμερα, αποτελεί μια ιδιαίτερα ελκυστική ιδέα, αφού καθιστά δυνατή την ταξινόμηση των οίνων ανάλογα με το φαινολικό τους περιεχόμενο και εκτιμά τα αποτελέσματα των οινοποιητικών διεργασιών στην εκχύλιση αυτών των συστατικών. Βέβαια, η έκφραση μιας γενικής τιμής, με την έννοια του βάρους ορισμένων συστατικών (οιολογικές ταννίνες, γαλλικό οξύ, κατεχίνη κ.α.), τα οποία αντιπροσωπεύουν ένα μέρος, κάποιες φορές πολύ μικρό, των φαινολικών συστατικών του μέσου, δύσκολα μπορεί να δικαιολογηθεί. Οι μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση των φαινολικών συστατικών του οίνου θα πρέπει να πληρούν τρεις βασικές προϋποθέσεις. Να είναι γρήγορες, τα αποτελέσματά τους να είναι επαναλήψιμα και να περιλαμβάνουν όλα τα φαινολικά μόρια. Οι διάφορες μέθοδοι βασίζονται στις χημικές

ιδιότητες των μορίων αυτών. Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών εφαρμόζονται δύο μέθοδοι, ο δείκτης ολικών φαινολών των Flanzky και Roux (1958) και Ribéreau-Gayon (1966), και η μέθοδος Folin Ciocalteu του Waterman and Mole (1994). Η μέθοδος του δείκτη των ολικών φαινολών, που γίνεται με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm, είναι προτιμότερη από την Folin Ciocalteu, εξαιτίας των πολλών πλεονεκτημάτων της, τα οποία περιλαμβάνουν ταχύτητα και επαναληψιμότητα. Βέβαια, αν και οι βενζολικοί πυρήνες έχουν τη μέγιστη απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος, ορισμένα μόρια, όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες, απορροφούν αν και δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στο ίδιο μήκος κύματος. Παρόλα αυτά, αφού τα μόρια αυτά απαντώνται στον οίνο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, το σφάλμα της μέτρησης θεωρείται αμελητέο. Με την εφαρμογή της μεθόδου του δείκτη των ολικών φαινολών, λοιπόν, γίνεται και ο προσδιορισμός της συνεισφοράς των φαινολικών οξέων, αλλά και διάφορων μη φαινολικών ενώσεων. Η τιμή που αντιστοιχεί στις ενώσεις αυτές είναι σχεδόν σταθερή, με μέσο όρο το 7, για ερυθρούς και για λευκούς οίνους. Στους ερυθρούς οίνους μπορούμε να κάνουμε την παραδοχή πως η τιμή της απορρόφησης στα 280 nm ισούται με το άθροισμα της απορρόφησης των φαινολικών οξέων, αλλά και των διάφορων μη φαινολικών ενώσεων με τις απορροφήσεις των ανθοκυανών και των ταννινών. Η τιμή αυτή μπορεί να τροποποιηθεί σε ένα βαθμό λόγω της αύξησης που προκαλείται στη συγκέντρωση του γαλλικού οξέος και των ελλαγιταννινών, κατά τη διάρκεια της παλαιώσης σε καινούρια βαρέλια. Η μέθοδος Folin Ciocalteu έχει, για τους λόγους που αναφέρθηκαν, πιο περιορισμένη εφαρμογή. Βασίζεται στην οξειδωση των φαινολών σε αλκαλικό περιβάλλον, με μίγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος. Πρέπει να σημειωθεί ότι την ίδια αντίδραση δίνουν και άλλα συστατικά, όπως τα ανάγοντα σάκχαρα και τα νουκλεϊνικά οξέα, αυτό όμως δεν αποτελεί πρόβλημα όταν η μέθοδος εφαρμόζεται σε ξηρούς οίνους, όπου η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα είναι της τάξης των 20 mg/L, οπότε η συνεισφορά τους στην τιμή της μέτρησης μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982, Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006). Η Folin-Ciocalteu είναι η μέθοδος αναφοράς του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (OIV) και χρησιμοποιείται στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως επίσημη μέθοδος ανάλυσης λόγω της απλότητάς του και των καλών τιμών επαναληψιμότητας, ενώ η μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm που επίσης χρησιμοποιείται ως μια αρκετά απλούστερη αλλά λιγότερο ευαίσθητη μέθοδο (Luque de Castro *et al.*, 2005). Τα κύρια μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι η υπερεκτίμηση της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες, λόγω της συμβολής των μη-φαινολικών ουσιών στην φασματοφωτομετρική απορρόφηση, η διαφορά στη συμβολή των διαφόρων τύπων πολυφαινολικών (Blasco *et al.*, 2005. Escarpa and González 2001. Everette *et al.*, 2010).

4.5 Ολικές ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες βρίσκονται στον οίνο σε διάφορες μορφές, είτε σαν ελεύθερες ανθοκυάνες, είτε συνδυασμένες με ταννίνες. Η ακεταλδεΐδη, οι ταννίνες και άλλες φαινολικές ενώσεις (π.χ., κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) που συμμετέχουν στις διαδικασίες της συμπύκνωσης με τις ανθοκυάνες, οδηγώντας στο σχηματισμό πολυμερών (Timberlake and Bridle, 1976). Αυτές οι πρόσφατα σχηματισμένες χρωστικές ουσίες είναι χημικά περισσότερο σταθερές από τις ελεύθερες μονομερείς μορφές, και σταθεροποιούν το χρώμα του οίνου που αλλάζει σε μια πιο κεραμιδί απόχρωση (Mateus and de Freitas, 2001). Από το σύνολο των ανθοκυανών, ορισμένες είναι αποχρωματισμένες από το διοξειδίο του θείου, ενώ οι υπόλοιπες δεν έχουν επηρεαστεί. Για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών δεν υπάρχει

ακριβής μέθοδος, οπότε η τιμή τους μπορεί μόνο να εκτιμηθεί. Βέβαια, μια γενική τιμή για τις ελεύθερες ανθοκυάνες και για αυτές οι οποίες έχουν αποχρωματιστεί από το διοξείδιο του θείου, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί, με τη χρήση χημικών και χρωματογραφικών μεθόδων. Οι χημικές μέθοδοι βασίζονται σε συγκεκριμένες ιδιότητες των ανθοκυανών, όπως είναι η διαφοροποίηση του χρώματός τους, ανάλογα με την τιμή του pH και ο αποχρωματισμός τους από το διοξείδιο του θείου, και αναπτύχθηκαν από τους Ribéreau-Gayon και Stonestreet (1965). Και οι δύο αυτές μέθοδοι μετράνε το άθροισμα των ελεύθερων και των αποχρωματισμένων ανθοκυανών. Η μέθοδος που χρησιμοποιεί τις διαφορές ανάλογα με την τιμή του pH είναι πιο ευαίσθητη στην παρουσία ελεύθερου διοξειδίου του θείου στον οίνο, ενώ η μέθοδος του αποχρωματισμού είναι περισσότερο αξιόπιστη, οπότε και έχει ευρεία αποδοχή (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

4.6 Ολικές Ταννίνες

Οι ταννίνες των ερυθρών οίνων αποτελούνται από αλυσίδες πολυμερισμένων φλαβονολών (προκυανιδίνες). Οι προκυανιδίνες αυτές είτε είναι ομογενείς, με κανονικότητα στους δεσμούς τους, είτε είναι ετερογενείς, με διαφορετικούς δεσμούς. Και στις δύο περιπτώσεις, ορισμένοι δεσμοί σπάνε, όταν τα μόρια των ταννινών θερμανθούν σε όξινο περιβάλλον και τα καρβοκατιόντα που προκύπτουν μετατρέπονται σε κάποιο βαθμό σε μόρια κυανιδίνης, εάν το μέσο ευνοεί την οξειδωση. Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό των ταννινών, με τη μέθοδο των Ribéreau-Gayon και Stonestreet (1966), η οποία εφαρμόζεται εδώ και πολλά χρόνια, αφού παρουσιάζει υψηλή επαναληψιμότητα και είναι εύκολη στην εφαρμογή της (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

4.7 Χαρακτηριστικά των ταννινών

Εκτός από τη συγκέντρωση των ταννινών, είναι απαραίτητη η γνώση των χαρακτηριστικών τους που καθορίζουν τις ιδιότητές τους. Η ιδανική προσέγγιση στο ζήτημα αυτό θα ήταν ο διαχωρισμός και ο προσδιορισμός των διάφορων ταννικών μορίων. Χάρη στις τεχνικές υψηλής απόδοσης είναι εφικτή η πραγματοποίηση τέτοιων αναλύσεων, αλλά η εφαρμογή τους εξακολουθεί να είναι δύσκολη. Με τα δεδομένα αυτά, η χρήση των ορισμένων τιμών, οι οποίες βασίζονται σε συγκεκριμένες ιδιότητες των ταννινών, μπορούν να συνδράμουν στην ερμηνεία ορισμένων χαρακτηριστικών του οίνου, συμπεριλαμβανομένης της σταθερότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Οι ακόλουθοι δείκτες είναι συμπληρωματικοί και μας δίνουν μια ικανοποιητική γνώση των ταννικών χαρακτηριστικών των ερυθρών οίνων (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

4.8 Δείκτης υδροχλωρικού οξέος

Ο Δείκτης Υδροχλωρικού οξέος που προσδιορίζεται με τη μέθοδο του Glories (1978) εκφράζει το ποσοστό των πολυμερισμένων ταννινών του οίνου και εξαρτάται από τις συνθήκες παλαίωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μείωση του πολυμερισμού, που παρατηρείται μετά το χειμώνα και τη διαύγαση, καθώς και μετά την πάροδο κάποιων ετών παλαίωσης σε φιάλη. Βασίζεται στην αστάθεια που εμφανίζουν οι προκυανιδίνες σε ένα έντονα όξινο, λόγω του υδροχλωρικού οξέος, περιβάλλον, όπου η ταχύτητα καθίζησης εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού. Οι τιμές του δείκτη κυμαίνονται από 5 έως 40. Σε τιμές πάνω από 35-40 οι ταννίνες του οίνου καταβυθίζονται, οπότε η τιμή μειώνεται. Στην αρχή της παλαίωσης σε βαρέλι, ένας πολύ ελαφρύς οίνος έχει χαμηλή τιμή, μεταξύ 5 και 10. Αντίθετα, ο οίνος που είναι κατάλληλος για παλαίωση έχει τιμή 10-25, ενώ ο οίνος που έχει

υψηλή συγκέντρωση σε πολύ έντονα πολυμερισμένα φαινολικά συστατικά έχει τιμή μεγαλύτερη από 25 (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

4.9 Ένταση χρώματος και απόχρωση

Το φάσμα των ερυθρών οίνων παρουσιάζει ένα μέγιστο στα 520 nm, το οποίο ελαττώνεται με την παλαιώση, ενώ στα 420 nm παρουσιάζεται ένα ελάχιστο, που κατά την παλαιώση παραμένει σταθερό ή αυξάνεται. Το μέγιστο της απορρόφησης που παρουσιάζουν οι νέοι ερυθροί οίνοι στα 520 nm οφείλεται στο καθαρό ερυθρό χρώμα των ελεύθερων ανθοκυανών υπό τη μορφή του φλαβυλίου. Με την πάροδο του χρόνου οι ανθοκυάνες καθιζάνουν ή σχηματίζουν σύμπλοκα με τις ταννίνες, τα οποία έχουν χρώμα καφεκόκκινο, οπότε επέρχεται μείωση της απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος. Όσο για την απορρόφηση που προκαλείται στα 420 nm, χαρακτηριστικό μήκος κύματος του κίτρινου χρώματος, αυτή οφείλεται κυρίως στις διάφορες μορφές ταννινών, το χρώμα των οποίων επικρατεί στους παλαιωμένους οίνους. Η ένταση του χρώματος και η απόχρωση, όπως ορίστηκαν από τον Sudrau (1958), λαμβάνουν υπόψη τους μόνο τη συνεισφορά του κόκκινου και του κίτρινου χρώματος. Η επικρατούσα προσέγγιση στην ανάλυση του χρώματος γίνεται με τη μέθοδο Glories (1984) και περιλαμβάνει μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας στα 420 και στα 520 nm, αλλά και στα 620 nm, προκειμένου να περιληφθεί και το μπλε χρώμα των νέων ερυθρών οίνων, που οφείλεται στις ανθοκυάνες όταν αυτές βρίσκονται στη μορφή της άνυδρης βάσης. Πιθανώς εξαιτίας της κολλοειδούς κατάστασης των χρωστικών ενώσεων δεν υπάρχει άμεση αναλογία μεταξύ της απορρόφησης και της διάλυσης. Συνεπώς, οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε κυψελίδα πάχους 1 mm, με τη χρήση αδιάλυτου οίνου. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζονται οι τιμές που περιγράφουν το χρώμα του οίνου. Η χρωματική ένταση αντιπροσωπεύει την ποσότητα του χρώματος και παρουσιάζει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των διάφορων ποικιλιών. Προκύπτει από το άθροισμα των οπτικών πυκνοτήτων στα 420, 520 και 620 nm. Τιμές έντασης από 0-6 χαρακτηρίζουν ανοιχτόχρωμους οίνους, από 6-10 μέτρια ερυθρούς οίνους και από 10 και πάνω βαθιά ερυθρούς. Η απόχρωση αντιπροσωπεύει την εξέλιξη του χρώματος προς το πορτοκαλί. Οι νέοι οίνοι παρουσιάζουν τιμές απόχρωσης της τάξης του 0.5-0.7, οι οποίες αυξάνονται με την παλαιώση, φθάνοντας στα ανώτατα όρια που κυμαίνονται στο 1.2-1.3. Η τιμή της απόχρωσης προκύπτει από το πηλίκο των οπτικών πυκνοτήτων στα 420 προς τα 520 nm. Στην περίπτωση των λευκών οίνων η εκτίμηση του χρώματος γίνεται με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm, που είναι το μήκος κύματος στο οποίο μετράται το κίτρινο χρώμα. Η ένδειξη στα 420 nm των λευκών οίνων δείχνει το βαθμό οξειδωσής τους, όσο πιο οξειδωμένος είναι ένας λευκός οίνος, τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982, Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Κουράκου, 1998, Castaneda-Ovado, et al., 2009).

4.10 Δείκτης Ιονισμού

Ο Δείκτης Ιονισμού που προσδιορίζεται με τη μέθοδο του Glories (1978) και βασίζεται στη δουλειά των Somers και Evans (1974), χρησιμοποιείται στον καθορισμό του ποσοστού των ελεύθερων και ενωμένων ανθοκυανών που μετέχουν στη δημιουργία του χρώματος του οίνου, πρόκειται δηλαδή για τις ολικές ανθοκυάνες που βρίσκονται στην ερυθρά μορφή (φλαβύλιο). Για τον υπολογισμό της τιμής του Δείκτη Ιονισμού ο οίνος αποχρωματίζεται με

περίσσεια διοξειδίου του θείου στο κανονικό pH του οίνου, οπότε και προσδιορίζεται το ποσό των ελεύθερων και ενωμένων με ταννίνες ανθοκυανών που είναι χρωματισμένες και αντιδρούν με το διοξείδιο του θείου. Η διαδικασία του αποχρωματισμού επαναλαμβάνεται και σε pH 1.2, όπου το σύνολο σχεδόν (95 %) των ανθοκυανών μετατρέπεται στην έγχρωμη μορφή του φλαβυλίου. Η τιμή του Δείκτη Ιονισμού για νέους οίνους κυμαίνεται από 10 έως 30 % και αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, φτάνοντας το 80 με 90 % σε παλαιωμένους οίνους. Εάν οι χρωστικές ενώσεις του ερυθρού οίνου αποτελούνται μόνο από ελεύθερες ανθοκυάνες, στο σύνθητες pH (3.4-4.0) και με μια μέση συγκέντρωση ελεύθερου διοξειδίου του θείου (10-30 mg/L), το ποσοστό των χρωματισμένων ανθοκυανών θα είναι χαμηλότερο (3-14 %). Οι νέες χρωστικές που παράγονται όταν οι ανθοκυάνες ενώνονται με ταννίνες είναι σημαντικά λιγότερο ευαίσθητες στον αποχρωματισμό λόγω του pH και του διοξειδίου του θείου, οπότε το ποσοστό των χρωματισμένων ανθοκυανών αυξάνεται. Αυτό το φαινόμενο συνεχίζεται σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας παλαίωσης. Μια υψηλή τιμή του δείκτη σε έναν πολύ νέο οίνο αποτελεί ένδειξη της εμπλοκής των ταννινών με τα κατιόντα του φλαβυλίου (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982, Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

4.11 Ανθοκυάνες με HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολύπλοκων ανόργανων και οργανικών μιγμάτων καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, με τη χρήση μίας κινητής φάσης (διαλύτης ή μίγμα διαλυτών) και μίας στατικής φάσης (στήλη). Η μεγαλύτερη απόδοση στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης επιτυγχάνεται με χαμηλές ταχύτητες ροής (και συνεπώς μεγάλη διάρκεια διαχωρισμού), με την εφαρμογή υψηλής πίεσης και τη χρήση μικρών σωματιδίων ως υλικό πλήρωσης της στήλης. Επίσης, για την επίτευξη καλού διαχωρισμού πολλών συστατικών ενός δείγματος συνίσταται η βαθμιδωτή έκλουση, όπου η ισχύς της κινητή φάσης μεταβάλλεται (Pecsok, R.L. *et al.*, 1980). Η HPLC χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση των φαινολικών συστατικών των σταφυλιών και των οίνων (Del Alamo, *et al.*, 2004, Kallithraka, *et al.*, 2005, Lopez, *et al.*, 2001, Roussis, *et al.*, 2008, Sakkiadi, *et al.*, 2004, Versari, *et al.*, 2008, Luque-Rodriguez, *et al.*, 2007, Garcia-Falcon, *et al.*, 2007, Alvarez, *et al.*, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1 Στόχος και σχεδιασμός πειράματος

Σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής είναι να διερευνηθεί η επίδραση των διαφορετικών ειδών και προέλευσης βαρελιών στη χημική σύσταση και τις οργανοληπτικές ιδιότητες, οίνου της ποικιλίας Syrah. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στη μελέτη των πολυφαινολικών συστατικών, καθώς αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες ποιότητας των οίνων και ιδιαίτερα των ερυθρών. Για να επιτευχθεί ο στόχος της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής συνεργαστήκαμε με ένα οινοποιείο, το οποίο μας εφοδίασε με τα απαραίτητα δείγματα οίνου, για όλο το χρονικό διάστημα της διενέργειας των αναλύσεων. Το οινοποιείο ήταν το κτήμα Kitrus που βρίσκεται στην περιοχή της Πιερίας. Η ποικιλία που

χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση του πειράματος ήταν η ποικιλία Syrah που παράχθηκε από το κτήμα Kitrus (2013). Ο αμπελώνας του κτήματος Κίτρος είναι φυτεμένος σε βορειοανατολικού προσανατολισμού πλαγιά στην Πύδνα, και συγκεκριμένα στην περιοχή Κίτρος της Βόρειας Πιερίας. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνταν από τον ίδιο οίνο τοποθετημένο σε διαφορετικού είδους βαρέλια. Ο οίνος ήταν 12 μήνες σε βαρέλι γαλλικής δρυός, αμερικάνικης δρυός και παλαιού γαλλικού βαρελιού (χρησιμοποιημένο το 2011) και ένα δείγμα ήταν σε ανοξείδωτη δεξαμενή. Μετά την οινοποίηση, πραγματοποιήθηκαν οι κλασσικές αναλύσεις των οίνων. Σε αυτές τις αναλύσεις περιλαμβάνονται η μέτρηση του αλκοολικού τίτλου του οίνου, η ενεργή οξύτητα (pH) και η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν στην πειραματική διαδικασία ήταν **το είδος του ξύλου του βαρελιού** (γαλλική δρυς, αμερικανική δρυς, παλαιό βαρέλι του 2011). Στα τέσσερα αυτά δείγματα πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω μετρήσεις:

- αλκοολικός τίτλος % vol
- ογκ. οξύτητα (g/L τρυγικού οξέος)
- pH
- Ένταση – απόχρωση
- Ολικές ανθοκυάνες
- Δείκτης ιονισμού
- Δείκτης ολικών φαινολικών (Δ.Φ.Ο)
- Ολικά φαινολικά με τη μέθοδο folin-ciocalteau
- Ταννίνες με βρασμό (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες)
- Δείκτης HCl (πολυμερισμένες ταννίνες – ικανότητα παλαίωσης)
- Ταννίνες με τη μέθοδο BSA (δέσμευση από πρωτεΐνες – δείκτης συυπτικότητας)
- Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – μέθοδος DPPH
- Μέτρηση συμυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose σε οίνους
- Προσδιορισμός ελλαγικών ταννινών με HPLC
- Προσδιορισμός ανθοκυανών με HPLC
- Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οίνος ήταν εμφιαλωμένος σε μπουκάλια των 750 mL και σφραγισμένος με φελλό. Τα δεδομένα αναλύθηκαν στατιστικά με την ανάλυση της διακύμανσης (analysis of variance - ANOVA) για έναν παράγοντα, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, του προγράμματος Statgraphics centurion XVI (Statpoint Technologies, Virginia, USA). Για τη σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Fisher's LSD (Least Significant Difference) test.

5.2 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

5.2.1 Χαρακτηριστικά ποικιλιών που μελετήθηκαν

Η ποικιλία Syrah

Θεωρείται μία από τις κορυφαίες ερυθρές ποικιλίες, αν και ως το 1960 είχε περιορισμένη διάδοση (περίπου 40000 στρέμματα στη Γαλλία). Από το 1990 σημειώθηκε σημαντική αύξηση των καλλιεργούμενων εκτάσεων στη Γαλλία (370000 στρ.) και στις άλλες αμπελουργικές περιοχές, όπως την Αυστραλία (25000 στρ.), την Αργεντινή (43000 στρ.), τις


ΗΠΑ (Καλιφόρνια, 42000 στρ.). Για την προέλευση της υπάρχουν διαφορετικές απόψεις. Κατά μία εκδοχή προέρχεται από την επαρχία Chiraz του Ιράν, κατά μια άλλη από της Συρακούσες και κατά μια Τρίτη από τη Σύρο. Επικρατέστερη θεωρείται η άποψη ότι είναι γηγενής ποικιλία της περιοχής Hermitage (Γαλλία, κοντά στις Άλπεις) και πιθανόν προήλθε από πληθυσμό πρέμωνων γνωστών από τη ρωμαϊκή εποχή με την ονομασία *Allobrogica* (3^{ος} αι. π.Χ.). Στην Ελλάδα (9500 στρ. περίπου) συνιστάται για τα αμπελουργικά διαμερίσματα της Πελοποννήσου, της Στερεάς Ελλάδας, της Θεσσαλίας, της Μακεδονίας, της Θράκης, της Κρήτης και της Δωδεκανήσου. Πρόκειται για πολυδυναμική ερυθρά ποικιλία αμπέλου, η οποία δίνει ποικιλιακούς οίνους υψηλής ποιότητας (ειδικά σε περιοχές που βρίσκονται στο βόρειο όριο της καλλιέργειας της αμπέλου), που χαρακτηρίζονται από έντονο, βαθύ ερυθρό χρώμα, πλούσιο σώμα, μεγάλη περιεκτικότητα σε ταννίνες, έντονα αρώματα, υψηλό αλκοολικό βαθμό και μέτρια οξύτητα. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι στο γλεύκος της Syrah περιέχονται πρόδρομες αρωματικές ουσίες (glucosyl-glucoses), που θεωρείται ότι δεν βρίσκονται στο γλεύκος άλλων ποικιλιών αμπέλου. Οι χαρακτήρες ποιότητας των οίνων επηρεάζονται από τον κλώνο της ποικιλίας, τις συνθήκες περιβάλλοντος και την αμπελοκομική τεχνική, βελτιώνονται δε ύστερα από παλαίωση. Γενικά είναι οίνοι μακράς ζωής και βραδείας παλαίωσης. Σε περιπτώσεις μεγάλης παραγωγής χρειάζονται 10-20 χρόνια για να αποκτήσουν το βέλτιστο των ιδιοτήτων. Σε χρονιές με μικρότερη παραγωγή αρκούν 5-6 χρόνια για την παλαίωση. Αρνητικά επιδρά η αύξηση της κατά πρέμνο παραγωγής στους χαρακτήρες ποιότητας της ποικιλίας. Το ανώτατο επιτρεπόμενο όριο για τους αμπελώνες ονομασίας προέλευσης (Γαλλία) είναι 4 εκατόλιτρα ανά στρέμμα, που σε ορισμένες περιπτώσεις φτάνει τα 4,5 εκατόλιτρα ανά στρέμμα. Στην Αυστραλία και στη Νέα Ζηλανδία η απόδοση είναι σημαντικά μεγαλύτερη και συχνά αναφέρονται παραγωγές 12 και πλέον εκατόλιτρων ανά στρέμμα, χωρίς αισθητή μείωση της ποιότητας. Αν και η εκβλάστηση των λανθανόντων οφθαλμών είναι σχετικά όψιμη, εντούτοις η πορεία ωρίμασης ακολουθεί ταχείς ρυθμούς που επιβάλλουν συνεχή παρακολούθηση ώστε ο τρυγητός να γίνει στον κατάλληλο βαθμό τεχνολογικής ωριμότητας και να αποφευχθεί η υπερωρίμαση. Κατά το τέλος της περιόδου ωρίμασης, όταν η περιεκτικότητα των ραγών σε σάκχαρα είναι 220 g/L περίπου, οι ράγες είναι ευαίσθητες στην αφυδάτωση, με αρνητικές συνέπειες στην ποιότητα και την ποσότητα παραγωγής. Στην Ελλάδα από το γλεύκος της ποικιλίας Syrah (περιεκτικότητα σε σάκχαρα 210-220 g/L, οξύτητα 6,8-7,5 g/L σε τρυγικό οξύ, pH 3,3-3,5) παρασκευάζονται ποικιλιακοί ερυθροί οίνοι ποιότητας (Σταυρακάκης, 2009).



Εικόνα 17. Σταφυλή της ποικιλίας Syrah

5.2.2 Οργανοληπτική ανάλυση

Αρχικά, το κάθε δείγμα βαθμολογήθηκε για κάθε ένα από τα χαρακτηριστικά του από 16 δοκιμαστές. Η ανώτερη βαθμολογία που μπορούσε να πάρει ένα δείγμα από το άθροισμα όλων των χαρακτηριστικών είναι 20. Η δοκιμασία των δειγμάτων έγινε εις διπλούν από κάθε δοκιμαστή, αθροίστηκαν οι βαθμολογίες όλων για το κάθε δείγμα και για τις δύο επαναλήψεις και βγήκε ο μέσος όρος. Σε κάθε δοκιμαστή δόθηκε ένα φύλλο με τα χαρακτηριστικά του οίνου (εμφάνιση, άρωμα, γεύση και υφή, επίγευση, γενική εντύπωση) και η κλίμακα με βάση την οποία θα γινόταν η βαθμολόγηση. Οι δοκιμαστές χρησιμοποίησαν μία κλίμακα από 0 (δυσάρεστη) ως 3 (εξάισιο) για την εμφάνιση, 0 ως 6 για το άρωμα, 0 ως 6 για τη γεύση και υφή, 0 ως 3 για την επίγευση και 0 ως 3 για την αξιολόγηση της γενικής εντύπωσης. Η κλιμάκωση της αξιολόγησης του κάθε χαρακτηριστικού του οίνου φαίνεται πιο αναλυτικά στην εικόνα 18, ενώ στην εικόνα 19 παρουσιάζεται η φόρμα συμπλήρωσης των δοκιμαστών. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο Statgraphics centurion XVI (Statpoint Technologies, Virginia, USA).

 Wine Evaluation Chart									
Name: _____		Date: _____		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> A W S </div>		Place: _____		Theme: _____	
See Reverse Side for Scoring Guidelines									
	Wine	Price	Appearance 3 Max	Aroma / Bouquet 6 Max	Taste / Texture 6 Max	Aftertaste 3 Max	Overall Impression 2 Max	Total Score 20 Max	
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									

Εικόνα 19. Φόρμα αξιολόγησης χαρακτηριστικών οίνου (Wine Evaluation Form. The American Wine Society).

5.2.3 Ένταση - απόχρωση

Για τον προσδιορισμό της έντασης και της απόχρωσης του χρώματος των οίνων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Glories (1984), κατά την οποία λαμβάνονται οι απορροφήσεις σε μήκος κύματος 420, 520 και 620 nm, από φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού. Η ένταση του χρώματος είναι το άθροισμα και των τριών απορροφήσεων, ενώ η απόχρωση είναι ο λόγος της απορρόφησης στα 420 nm προς αυτής στα 520 nm. Ο οίνος φυγοκεντρείται για 5 min στις 4000 στροφές. Σε φασματοφωτόμετρο μετρώνται οι απορροφήσεις στα 420 nm, 520 nm και 620 nm (λάμπα αλογόνου) με H₂O ως blank. Για τους λευκούς οίνους χρησιμοποιούνται κυψελίδες 10 mm, ενώ για τους ερυθρούς οίνους κυψελίδες 1 mm και το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται επί δέκα.

- Ένταση (E): είναι το άθροισμα των απορροφήσεων στα 420 nm, 520 nm και 620 nm

$$I = OD_{420} + OD_{520} + OD_{620}$$

- Απόχρωση (A): είναι ο λόγος της απορρόφησης στα 420 nm προς την απορρόφηση στα 520 nm.

$$H = OD\ 420 / OD\ 520$$

Το χρώμα των ερυθρών οίνων είναι το άθροισμα των χρωμάτων κίτρινου, κόκκινου και κυανού. Τα φάσματα απορρόφησης τους παρουσιάζουν ένα μέγιστο στα 520 nm, το οποίο ελαττώνεται με την παλαίωση, και ένα ελάχιστο στα 420 nm, που κατά την παλαίωση αυξάνει ή παραμένει σταθερό. Η ένταση αντιπροσωπεύει την ποσότητα του χρώματος και παρουσιάζει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών. Η απόχρωση αντιπροσωπεύει την εξέλιξη του χρώματος προς το πορτοκαλί και εκφράζει το βαθμό οξείδωσης των οίνων. Όσο πιο οξειδωμένος είναι ο οίνος, τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της απόχρωσης. (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982, Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Κουράκου, 1998).

5.2.4 . Μέτρηση pH και ογκομετρούμενης οξύτητας

Σαν ενεργή οξύτητα ή pH καλείται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και δίνουν H^+ . Εξαρτάται όχι μόνο από τη συγκέντρωση αλλά και από το είδος των οργανικών οξέων, π.χ. ο οίνος που περιέχει μια ορισμένη ποσότητα τρυγικού οξέος είναι πιο όξινος από τον οίνο που περιέχει ισόποσο ηλεκτρικό οξύ λόγω του διαφορετικού βαθμού διάστασης των ελεύθερων καρβοξυλομάδων. Το pH των οίνων, ανάλογα με την αμπελοργική περιοχή, την ποικιλία της αμπέλου και την τεχνική παρασκευής τους κυμαίνεται από 2,8 ως 4,2.

Υλικά και εξοπλισμός

- Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 0,1 M.
- Διάλυμα κυανού της βρωμοθυμόλης (4 g/L)
- προχοΐδα, κωνική φιάλη, σιφώνια
- pH-μετρο
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Ποτήρι ζέσεως, μαγνήτης

Μέτρηση ογκομετρούμενης οξύτητας

α. Προετοιμασία δείγματος: Το δείγμα (γλεύκος ή οίνος) πρέπει να είναι διαυγές. Επίσης πρέπει να έχει απομακρυνθεί ο αέρας (με αντλία κενού) γιατί το CO_2 παρεμποδίζει τη μέτρηση. Αυτό είναι απαραίτητο, ειδικά σε γλεύκος που ζυμώνει και στον οίνο.

β. Μέτρηση οξύτητας με χρήση δείκτη:

Γεμίζουμε μια προχοΐδα με πρότυπο διάλυμα NaOH 0.1 M και παίρνουμε την αρχική τιμή. Σε μια κωνική φιάλη τοποθετούμε 10 mL δείγματος, 1 mL δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης και περίπου 30 mL αποσταγμένου νερού. Ανακατεύουμε και τιτλοδοτούμε με το διάλυμα του NaOH, αναδεδώντας συνεχώς, μέχρι την αλλαγή του χρώματος (κυανοπράσινη χροιά). Σημειώνουμε την τελική τιμή της προχοΐδας. Από τη διαφορά αρχικής και τελικής τιμής βρίσκεται ο αριθμός των καταναλωθέντων ml, έστω n. Έκφραση αποτελεσμάτων:

Η ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο (meq/L) δίνεται από τον τύπο:

$$A = 10 * n \quad ,\text{με ένα δεκαδικό ψηφίο.}$$

Η ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο (g/L) δίνεται από τον τύπο:

$$A = 0.75 * n \quad ,\text{με ένα δεκαδικό ψηφίο.}$$

Μέτρηση Ph

Αρχικά γίνεται η βαθμονόμηση του οργάνου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή με ρυθμιστικά διαλύματα γνωστού pH, συνήθως 4 και 7. Κατόπιν σε ένα ποτήρι ζέσεως (που περιέχει ένα μικρό μαγνήτη και βρίσκεται πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα) τοποθετείται επαρκής ποσότητα δείγματος έτσι ώστε το ηλεκτρόδιο να είναι εμβαπτισμένο και να μην ακουμπάει στα τοιχώματα του ποτηριού ή στον μαγνήτη. Η θερμοκρασία του δείγματος πρέπει να είναι 20-25 °C. Όταν η τιμή σταθεροποιηθεί παίρνουμε τη μέτρηση. Λαμβάνονται τουλάχιστον δύο μετρήσεις από το ίδιο δείγμα και καταγράφεται ο μέσος όρος με δύο δεκαδικά ψηφία.

5.2.5 Αλκοολικός τίτλος

Η αιθυλική αλκοόλη που βρίσκεται στους οίνους παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους. Αντιπροσωπεύει το 9-15 % του όγκου τους και είναι το κυριότερο συστατικό μετά το νερό. Η μέτρηση της περιεκτικότητας ενός οίνου σε αλκοόλη έχει την αρχή της στον Gay-Lussac και γίνεται με φυσικό τρόπο (απόσταξη – πυκνομετρία). Για να εκφραστεί η περιεκτικότητα σε αλκοόλ χρησιμοποιήθηκε ο όρος αλκοολικός βαθμός που ισούται με τον αριθμό των λίτρων καθαρής αλκοόλης που περιέχονται σε 100 λίτρα προϊόντος στους 15 °C. Κατά καιρούς προτάθηκαν διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού κι έκφρασης της αιθυλικής αλκοόλης που παρουσίαζαν διάφορα προβλήματα. Στα πλαίσια του OIV ο όρος ‘αλκοολικός βαθμός’ έχει αντικατασταθεί από τον όρο αλκοολικός τίτλος κατ’ όγκο. Αλκοολικός τίτλος κατ’ όγκο ενός οινικού προϊόντος ονομάζεται ο αριθμός των λίτρων άνυδρης αιθανόλης που περιέχεται σε 100 λίτρα του προϊόντος αυτού, όταν οι δύο όγκοι μετριοούνται σε θερμοκρασία 20 °C. Συμβολίζεται ως ‘% vol’. Για τον προσδιορισμό του προβλέπονται διάφορες μέθοδοι που βασίζονται όλες στην απόσταξη της αλκοόλης του οίνου. Η διαφορά τους βρίσκεται στον τρόπο μέτρησης της αλκοόλης στο απόσταγμα. Στη μέθοδο αναφοράς ο προσδιορισμός της πυκνότητας του αποστάγματος γίνεται με τη μέθοδο της ληκύθου. Στις συνήθειες μεθόδους αναφέρονται ο προσδιορισμός του αλκοολικού τίτλου με αραιόμετρο, με υδροστατικό ζυγό και με διαθλασιμετρία. Θα πρέπει να παρατηρηθεί ότι στον αλκοολικό τίτλο συνυπολογίζονται τα ομόλογα της αιθανόλης καθώς επίσης και η εστεροποιημένη αιθανόλη και τα ομόλογα της μιας και περνάνε στο απόσταγμα.

Υλικά και εξοπλισμός

- Συσκευή απόσταξης (Εικόνα 21) που περιλαμβάνει
- σφαιρική φιάλη χωρητικότητας ενός λίτρου με εσφυρισμένο στόμιο

- επανορθωτική αποστακτική στήλη ύψους περίπου 20 cm ή οποιαδήποτε άλλη διάταξη με σκοπό την παρεμπόδιση διέλευσης πιο πτητικών ουσιών που προκαλούν σφάλμα στο αποτέλεσμα της μέτρησης
- πηγή θερμότητας
- ψυκτήρας, στο άκρο του οποίου προσαρμόζεται λεπτός σωλήνας που μεταφέρει το απόσταγμα στον πυθμένα ογκομετρικής φιάλης που χρησιμεύει σαν υποδοχέας και που περιέχει μικρή ποσότητα ύδατος
- Ογκομετρική φιάλη των 200 mL
- Θερμόμετρο
- Εναιώρημα υδροξειδίου του ασβεστίου 2 M
- Αραιόμετρο – αλκοολόμετρο βαθμονομημένο στους 20 °C
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 250 mL

Διαδικασία προσδιορισμού

Απόσταξη: Σε μια ογκομετρική φιάλη των 200 mL τοποθετείται οίνος μέχρι τη χαραγή και μετριέται η θερμοκρασία. Κατόπιν το δείγμα μεταγγίζεται στη σφαιρική φιάλη της αποστακτικής συσκευής και η ογκομετρική ξεπλένεται τέσσερις φορές με 5 mL νερό κάθε φορά. Τα ξεπλύματα προστίθενται στη σφαιρική φιάλη. Για να γίνει αλκαλικό το δείγμα προστίθενται 10 mL εναιωρήματος CaOH και για να μην υπάρχει έντονος βρασμός τοποθετούνται μερικά τεμάχια πορώδους ανενεργού υλικού (ελαφρόπετρα). Η σφαιρική φιάλη συνδέεται στην αποστακτική και ξεκινάει η θέρμανση αλλά και η ψύξη. Το απόσταγμα συγκεντρώνεται στην ογκομετρική φιάλη των 200 mL που χρησιμοποιήθηκε στην μέτρηση του οίνου. Συλλέγεται απόσταγμα οίνου ίσο με τα $\frac{3}{4}$ περίπου του αρχικού όγκου. Στο τέλος συμπληρώνεται στα 200 mL με απεσταγμένο νερό. Η θερμοκρασία του αποστάγματος δεν πρέπει να αποκλίνει από την αρχική θερμοκρασία πάνω από ± 2 °C. Ένα παράδειγμα συσκευής απόσταξης φαίνεται στην εικόνα 21.

Αραιομετρία: Το απόσταγμα αναμιγνύεται προσεκτικά με κυκλικές κινήσεις και μεταφέρεται στον ογκομετρικό κύλινδρο. Επιλέγεται ένα αλκοολόμετρο, που να πληροί τις προδιαγραφές που ορίζονται από την νομοθεσία και να έχει το κατάλληλο εύρος τιμών, κι εμβαπτίζεται στο απόσταγμα μαζί με ένα θερμόμετρο. Λαμβάνεται η θερμοκρασία και αφού ισορροπήσει το αλκοολόμετρο αμέσως μετά η ένδειξη (φαινομενικός αλκοολικός τίτλος). Η θερμοκρασία του υγρού δεν πρέπει να διαφέρει από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος πάνω από ± 5 °C. Ο φαινομενικός τίτλος διορθώνεται ως προς τη θερμοκρασία με τη βοήθεια του παρακάτω πίνακα (Εικόνα 20).

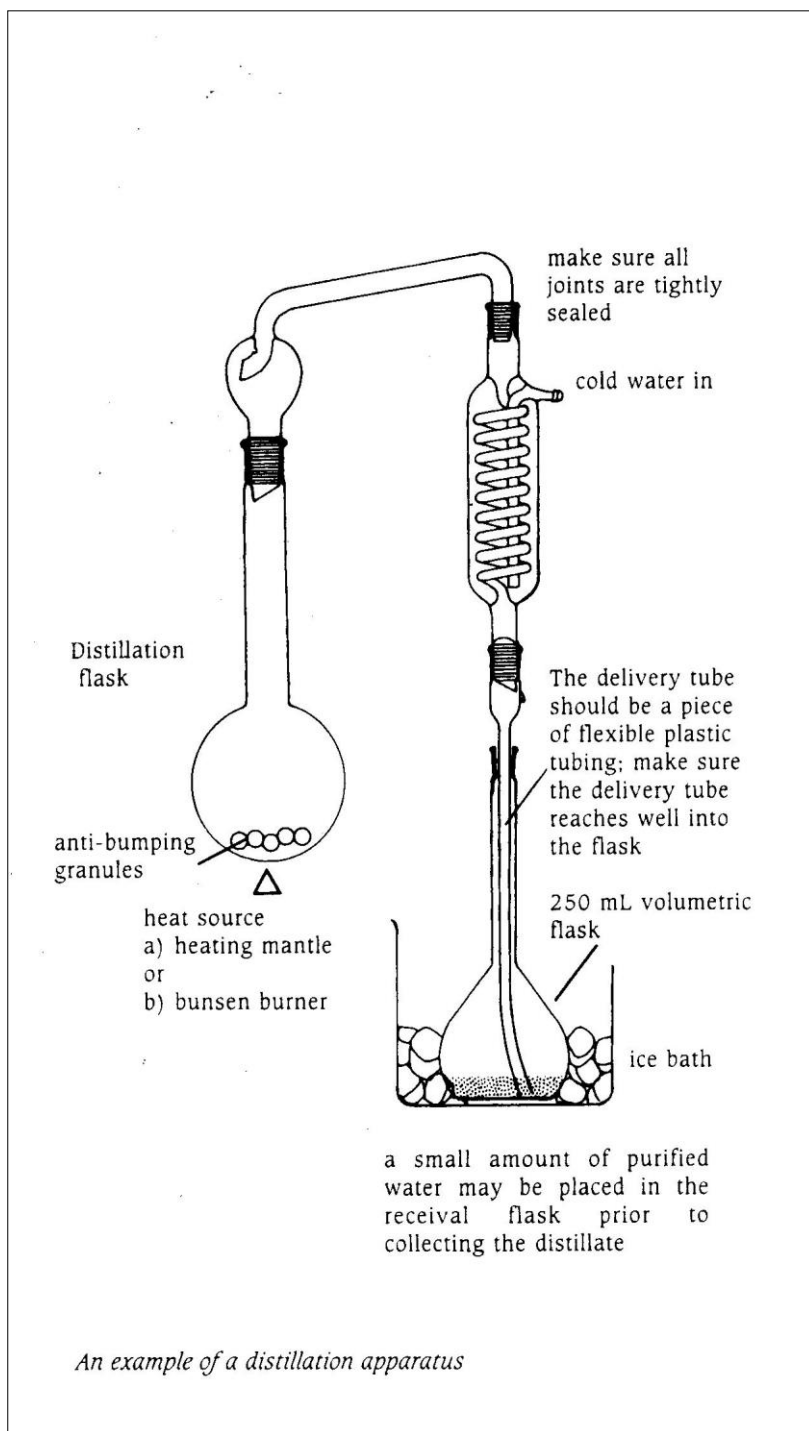
ΔΙΕΘΝΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΣΤΟΥΣ 20 °C

Πίνακας διορθώσεων του φαινομενικού αλκοολικού τίτλου ως προς τη θερμοκρασία

Στον φαινομενικό αλκοολικό τίτλο στους t °C (άλκοολόμετρο από κοινό γυαλί) προστίθεται ή αφαιρείται η ένδειξη του πίνακα

Θερμοκρασίες (°C)		Φαινομενικός αλκοολικός τίτλος																
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Προστίθεται	0	0,76	0,77	0,82	0,87	0,95	1,04	1,16	1,31	1,49	1,70	1,95	2,26	2,62	3,03	3,49	4,02	4,56
	1	0,81	0,83	0,87	0,92	1,00	1,09	1,20	1,35	1,52	1,73	1,97	2,26	2,59	2,97	3,40	3,87	4,36
	2	0,85	0,87	0,92	0,97	1,04	1,13	1,24	1,38	1,54	1,74	1,97	2,24	2,54	2,89	3,29	3,72	4,17
	3	0,88	0,91	0,95	1,00	1,07	1,15	1,26	1,39	1,55	1,73	1,95	2,20	2,48	2,80	3,16	3,55	3,95
	4	0,90	0,92	0,97	1,02	1,09	1,17	1,27	1,40	1,55	1,72	1,92	2,15	2,41	2,71	3,03	3,38	3,75
	5	0,91	0,93	0,98	1,03	1,10	1,17	1,27	1,39	1,53	1,69	1,87	2,08	2,33	2,60	2,89	3,21	3,54
	6	0,92	0,94	0,98	1,02	1,09	1,16	1,25	1,37	1,50	1,65	1,82	2,01	2,23	2,47	2,74	3,02	3,32
	7	0,91	0,93	0,97	1,01	1,07	1,14	1,23	1,33	1,45	1,59	1,75	1,92	2,12	2,34	2,58	2,83	3,10
	8	0,89	0,91	0,94	0,98	1,04	1,11	1,19	1,28	1,39	1,52	1,66	1,82	2,00	2,20	2,42	2,65	2,88
	9	0,86	0,88	0,91	0,95	1,01	1,07	1,14	1,23	1,33	1,44	1,57	1,71	1,87	2,05	2,24	2,44	2,65
	10	0,82	0,84	0,87	0,91	0,96	1,01	1,08	1,16	1,25	1,35	1,47	1,60	1,74	1,89	2,06	2,24	2,43
	11	0,78	0,79	0,82	0,86	0,90	0,95	1,01	1,08	1,16	1,25	1,36	1,47	1,60	1,73	1,88	2,03	2,20
	12	0,72	0,74	0,76	0,79	0,83	0,88	0,93	0,99	1,07	1,15	1,24	1,34	1,44	1,56	1,69	1,82	1,96
	13	0,66	0,67	0,69	0,72	0,76	0,80	0,84	0,90	0,96	1,03	1,11	1,19	1,28	1,38	1,49	1,61	1,73
	14	0,59	0,60	0,62	0,64	0,67	0,71	0,74	0,79	0,85	0,91	0,97	1,04	1,12	1,20	1,29	1,39	1,49
	15	0,51	0,52	0,53	0,55	0,58	0,61	0,64	0,68	0,73	0,77	0,83	0,89	0,95	1,02	1,09	1,16	1,24
	16	0,42	0,43	0,44	0,46	0,48	0,50	0,53	0,56	0,60	0,63	0,67	0,72	0,77	0,82	0,88	0,94	1,00
	17	0,33	0,33	0,34	0,35	0,37	0,39	0,41	0,43	0,46	0,48	0,51	0,55	0,59	0,62	0,67	0,71	0,75
	18	0,23	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,29	0,31	0,33	0,35	0,37	0,40	0,42	0,45	0,48	0,51
19	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,20	0,21	0,23	0,24	0,25	
Αφαιρείται	21		0,13	0,13	0,13	0,14	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,19	0,20	0,22	0,23	0,25	0,26
	22		0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,39	0,41	0,44	0,47	0,49	0,52
	23		0,40	0,41	0,42	0,44	0,45	0,47	0,49	0,51	0,54	0,57	0,60	0,63	0,66	0,70	0,74	0,78
	24		0,55	0,56	0,58	0,60	0,62	0,64	0,67	0,70	0,73	0,77	0,81	0,85	0,89	0,94	0,99	1,04
	25		0,69	0,71	0,73	0,76	0,79	0,82	0,85	0,89	0,93	0,97	1,02	1,07	1,13	1,19	1,25	1,31
	26		0,85	0,87	0,90	0,93	0,96	1,00	1,04	1,08	1,13	1,18	1,24	1,30	1,36	1,43	1,50	1,57
	27			1,03	1,07	1,11	1,15	1,19	1,23	1,28	1,34	1,40	1,46	1,53	1,60	1,68	1,76	1,84
	28			1,21	1,25	1,29	1,33	1,38	1,43	1,49	1,55	1,62	1,69	1,77	1,85	1,93	2,02	2,11
	29			1,39	1,43	1,47	1,52	1,58	1,63	1,70	1,76	1,84	1,92	2,01	2,10	2,19	2,29	2,39
	30			1,57	1,61	1,66	1,72	1,78	1,84	1,91	1,98	2,07	2,15	2,25	2,35	2,45	2,56	2,67
	31			1,75	1,80	1,86	1,92	1,98	2,05	2,13	2,21	2,30	2,39	2,49	2,60	2,71	2,83	2,94
	32			1,94	2,00	2,06	2,13	2,20	2,27	2,35	2,44	2,53	2,63	2,74	2,86	2,97	3,09	3,22
	33				2,20	2,27	2,34	2,42	2,50	2,58	2,67	2,77	2,88	2,99	3,12	3,24	3,37	3,51
	34				2,41	2,48	2,56	2,64	2,72	2,81	2,91	3,02	3,13	3,25	3,38	3,51	3,65	3,79
	35				2,62	2,70	2,78	2,86	2,95	3,05	3,16	3,27	3,39	3,51	3,64	3,78	3,93	4,08
	36				2,83	2,91	3,00	3,09	3,19	3,29	3,41	3,53	3,65	3,78	3,91	4,05	4,21	4,37
	37					3,13	3,23	3,33	3,43	3,54	3,65	3,78	3,91	4,04	4,18	4,33	4,49	4,65
	38					3,36	3,47	3,57	3,68	3,79	3,91	4,03	4,17	4,31	4,46	4,61	4,77	4,94
	39					3,59	3,70	3,81	3,93	4,05	4,17	4,30	4,44	4,58	4,74	4,90	5,06	5,23
	40					3,82	3,94	4,06	4,18	4,31	4,44	4,57	4,71	4,86	5,02	5,19	5,36	5,53

Εικόνα 20. Πίνακας προσδιορισμού αλκοολικού τίτλου



Εικόνα 21. Παράδειγμα συσκευής απόσταξης

5.2.6 Ολικές ανθοκυάνες

Ο προσδιορισμός των ολικών ανθοκυανών γίνεται με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Ribéreau-Gayon και Stonestreet (1965). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα των ανθοκυανών να δίνουν με το ιόν HSO_3^- άχρωμες ενώσεις. Μετά από προσθήκη ικανής περισσειας όξινου θεικού άλατος, η αλλαγή του χρώματος του οίνου είναι ανάλογη προς την περιεκτικότητα των ανθοκυανών. Αρχικά δημιουργούμε ένα κύριο διάλυμα:

1 mL οίνου (ή εκχυλίσματος)

1 mL αλκοολικού διαλύματος HCl 0.1% (B)

20 mL υδατικού διαλύματος HCl 2% (A)

Από το κύριο διάλυμα βάζουμε σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες από 5 ml (x2 για την επανάληψη). Στον πρώτο σωλήνα προστίθενται 2 ml απιονισμένο H_2O και στον δεύτερο σωλήνα 2 ml Na_2SO_3 . Κλείνουμε με parafilm. Μετά από 20 min μετρώνται οι απορροφήσεις των δυο δειγμάτων στα 520 nm σε κυψελίδες πλαστικές πάχους 10 mm. Μηδενίζουμε με H_2O . Η ποσότητα των ανθοκυανών δίνεται από τη σχέση:

$$\text{Ανθοκυάνες (mg/l)} = (\text{OD}_2 - \text{OD}_1) * 885,3$$

OD_1 = η απορρόφηση του αποχρωματισμένου δείγματος (SO_2)

OD_2 = η απορρόφηση του δείγματος στο οποίο προστέθηκε το d H_2O

Διαλύματα*:

A. Διάλυμα HCl 2% v/v: 54 ml πυκνού HCl 37% αραιώνονται στο 1 Lt με H_2O (pH 0,7)

B. διάλυμα όξινης αλκοόλης (HCl 0.1%) : σε ογκομετρική φιάλη ~70 ml αιθυλικής αλκοόλης προστίθεται 270 μL πυκνού HCl 37% και συμπληρώνουμε στα 100ml με αλκοόλη.

Γ. διάλυμα NaHSO_3 15%: σε ογκομετρική φιάλη 37,5 ml πυκνού διαλύματος 40% NaHSO_3 αραιώνονται στα 100 ml με H_2O .

5.2.7 Δείκτης ιονισμού

Ο δείκτης ιονισμού προσδιορίζεται με τη μέθοδο Glories et al. (1978), η οποία βασίζεται στην ιδιότητα των ανθοκυανών να μετατρέπονται στην έγχρωμη μορφή των φλαβυλίων σε ισχυρά όξινα περιβάλλον. Ο οίνος φυγοκεντρείται για 5 min στις 4000 στροφές. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες ετοιμάζονται τα εξής διαλύματα :

d1 = 5ml οίνου + 1ml H_2O ανάδευση με vortex. Μέτρηση με κυψελίδες υάλου πάχους 1mm.

d2 = 5ml οίνου + 1ml διαλύματος NaHSO_3 , ανάδευση με vortex. Μετά από 5 min μετράται η απορρόφηση με κυψελίδες υάλου πάχους 1mm.

d3 = 0,5ml οίνου + 1ml H₂O + 3,5ml διαλύματος HCl N/10 , ανάδευση με vortex. Μέτρηση σε κυψελίδες πλαστικές πάχους 10mm.

d4 = 0,5ml οίνου + 1ml διαλύματος 15% NaHSO₃ + 3,5ml διαλύματος HCl N/10 , ανάδευση με vortex. Μετά από 5min μετράται η απορρόφηση σε κυψελίδες πλαστικές πάχους 10mm.

Οι μετρήσεις γίνονται με λάμπα αλογόνου στα 520nm και μηδενισμός με H₂O. Βάση των παραπάνω απορροφήσεων υπολογίζονται τα μεγέθη (Δda) και (Δdγ) όπου συμμετοχή των χρωματισμένων ανθοκυανών : Δda = (d1-d2)*12/10 και σύνολο των μορίων των ανθοκυανών : Δdγ = (d3-d4)* 100/95

Ο βαθμός ιονισμού των ανθοκυανών δίνεται από την σχέση:

$$I\% = \Delta da / \Delta d\gamma * 100$$

Διαλύματα*:

A. Διάλυμα HCl 0.1N : σε ογκομετρική φιάλη ~70 ml νερού προστίθεται 830μL πυκνού HCl 37% και συμπληρώνουμε στα 100ml με H₂O.

B. Διάλυμα NaHSO₃ 15% : σε ογκομετρική φιάλη 37,5 ml πυκνού διαλύματος 40% NaHSO₃ αραιώνονται στα 100 ml με H₂O.

5.2.8 Δείκτης ολικών φαινολών (Δ.Φ.Ο.)

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών των οίνων εφαρμόστηκε η μέθοδος του Δείκτη Ολικών Φαινολών (ΔΦΟ) των Flanzky και Roux (1958) και Ribéreau-Gayon (1966). Ο οίνος φυγοκεντρείται για 5 min στις 4000 στροφές και αραιώνεται 1/100 με απιονισμένο H₂O. Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μήκος κύματος 280nm με κυψελίδα χαλαζία 10mm. Ο δείκτης ολικών φαινολικών προκύπτει από τη σχέση:

$$\Delta\Phi\text{O} = \text{OD}280 * 100$$

5.2.9 Ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών των οίνων εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu, όπως περιγράφεται από τους Waterman and Mole (1994). Ο οίνος φυγοκεντρείται για 5 min στις 4000 στροφές. Σε ογκομετρική φιάλη των 10ml με περίπου 5 ml H₂O τοποθετούνται:

	Ποσότητα οίνου	Folin-Ciocalteu	Na ₂ CO ₃ 20%
Ερυθρός οίνος	10μL,	0.5mL,	1.5mL,
Λευκός οίνος	100μL,	0.5mL,	1.5mL
blank	-	0.5mL	1.5mL

Συμπληρώνουμε με H₂O μέχρι τα 10ml.

Μετά από παραμονή 30 min μετράται η απορρόφηση στα 765nm με πλαστική κυψελίδα πάχους 10mm και με χρήση λάμπας αλογόνου, μηδενίζουμε με το blank. Ο υπολογισμός της συγκέντρωση των ολικών φαινολικών γίνεται μέσω της πρότυπης καμπύλης κατεχίνης (γαλλικού οξέος).

Λευκοί οίνοι : C mg/L κατεχίνης (γαλλικού οξέος).

Ερυθροί οίνοι : 10 x C mg/L κατεχίνης (γαλλικού οξέος).

Καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης (ή γαλλικού οξέος).

Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς παρασκευάζεται διάλυμα κατεχίνης (γαλλικού οξέος) με συγκέντρωση 1g/L. Η καμπύλη αναφοράς γίνεται για τις συγκεντρώσεις 50, 100, 250, 500 mg/L κατεχίνης (γαλλικού οξέος). Σε ογκομετρικές φιάλες των 10ml προστίθενται οι ανάλογες ποσότητες 0.5, 1, 2.5, 5 ml διαλύματος κατεχίνης (γαλλικού οξέος). 1g/L. Μετράμε με τη μέθοδο Folin το κάθε διάλυμα κατεχίνης (γαλλικού οξέος). Σε ογκομετρική φιάλη των 20ml με περίπου 10 ml H₂O τοποθετούνται:

	διάλυμα κατεχίνης (γαλλικού οξέος)	Folin-Ciocalteu	Na ₂ CO ₃ 20%
δείγμα	100μL	0,5mL	1,5mL
blank	-	0,5mL	1,5mL

Μετράμε τις απορροφήσεις στα 765nm με πλαστική κυψελίδα πάχους 10mm και με χρήση λάμπας αλογόνου, μηδενίζουμε με το blank. Τα διαλύματα της κατεχίνης (γαλλικού οξέος) διατηρούνται μέχρι 2 βδομάδες στου 4°C.

Διαλύματα*:

A. Διάλυμα Na₂CO₃ 20%: 20g άνυδρου Na₂CO₃ διαλύονται σε ποτήρι ζέσεως με λίγο νερό. Τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώνουμε με H₂O (διατηρείται για 2-3μέρες).

B. Διάλυμα κατεχίνης (γαλλικού οξέος) 1g/L: 100mg κατεχίνης (γαλλικού οξέος) διαλύονται σε 10ml αιθανόλης σε ογκομετρική φιάλη των 100ml. Η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται με H₂O μέχρι τα 100ml (διατηρείται για 1-2 μέρες).

5.2.10 Ταννίνες με βρασμό (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες)

Για τον προσδιορισμό των ταννινών εφαρμόστηκε η μέθοδος Ribereau-Gayon και Stonestreet (1966). Ο οίνος φυγοκεντρείται για 5 min στις 4000 στροφές και αραιώνεται 1/50 (500 μL στα 25 ml με H₂O) και φέρονται:

d₁ : σε απλό δοκιμαστικό σωλήνα, 2 ml αραιωμένου οίνου με 1 ml H₂O και 3 ml πυκνού HCl 37%.

d₂ : σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα εφοδιασμένο με πώμα, 2 ml αραιωμένου οίνου με 1 ml H₂O και 3 ml πυκνού HCl 37%.

Ο γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας πωματίζεται και παραμένει σε βρασμό για 45 min (100°C). Αφού ψυχθεί, προστίθεται και στους δύο σωλήνες 500μL αιθανόλης 95% για τη σταθεροποίηση του χρώματος. Μετρώνται οι οπτικές πυκνότητες των δύο δειγμάτων στα 550 nm, σε κυψελίδες πλαστικές πάχους 10 mm με λάμπα αλογόνου και μηδενισμός με H₂O. Το ποσό των ταννινών δίνεται από τη σχέση: **ταννίνες (g/L) = (d₂-d₁) x 19,35**

d₁ = απορρόφηση στα 550 nm του δείγματος χωρίς θέρμανση

d₂ = απορρόφηση στα 550 του δείγματος που θερμάνθηκε

Αν βρεθεί (d₂-d₁) ≤ 0,07 τότε η σχέση γίνεται: **ταννίνες (g/L) = (d₂-d₁) x 20,83**

5.2.11 Δείκτης HCL (πολυμερισμένες ταννίνες –ικανότητα παλαίωσης)

Ο δείκτης υδροχλωρικού οξέος εκφράζει το ποσοστό των πολυμερισμένων ταννινών που υπάρχουν στο κρασί και αποτελεί δείκτη ικανότητας παλαίωσης του οίνου. Ο προσδιορισμός αυτού του δείκτη γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο του Glories (1978) και στηρίζεται στην ιδιότητα των πολυμερισμένων ταννινών να καταβυθίζονται σε ισχυρά όξινο με υδροχλωρικό οξύ περιβάλλον. Η ταχύτητα καταβύθισης εξαρτάται από τον βαθμό πολυμερισμού των ταννινών. Ο οίνος φυγοκεντρείται για 5 min στις 4000 στροφές. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 2 ml κρασιού με 3 ml πυκνού HCl 37% και 1 ml H₂O. Αμέσως (χρόνος t = 0) λαμβάνεται 1 ml στο οποίο γίνεται αραιώση 1:30 με H₂O (29ml H₂O), σε vortex και μετράται η απορρόφηση d₀ σε κυψελίδες χαλαζία 10 mm και λάμπα δευτερίου στα 280 nm. Το υπόλοιπο αφήνεται σε ηρεμία περίπου 7 ώρες. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται, λαμβάνεται 1 ml στο οποίο γίνεται αραιώση 1:30 με H₂O σε vortex και μετράται η απορρόφηση d στα 280 nm. Ο δείκτης υδροχλωρικού οξέος δίνεται από τον τύπο:

$$\Delta\text{HCl \%} = (d_0 - d/d_0) \times 100$$

5.2.12 Χημική Εκτίμηση στυπτικότητας του οίνου με τη μέθοδο BSA

Η περιεκτικότητα των ταννινών (mg/L κατεχίνης) προσδιορίστηκε μετά από καταβύθιση με αλβουμίνη (BSA). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Kennedy et al., 2006), τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής συσχετίζονται ισχυρά με τη στυπτικότητα, ως εκ τούτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημική εκτίμηση της στυπτικότητας των οίνων. Σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται από τους Harbertson et al, (2003) ο οίνος αραιώνεται 1/10 με model wine και σε erpendorf τοποθετούνται 500μL αραιωμένου δείγματος με 1mL πρωτεϊνικού διαλύματος BSA. Γίνεται ήπια ανάδευση για 15min και το δείγμα φυγοκεντρείται για 10min στις 12000 rpm. Κρατάμε το ίζημα και προσθέτουμε 250 μL μη πρωτεϊνικού διαλύματος (διάλυμα A). Κάνουμε πάλι φυγοκέντρηση για 5min στις 12000 rpm και παίρνουμε το ίζημα. Στο ίζημα προσθέτουμε 875μL διαλύματος TEA-SDS και το αφήνουμε σε ηρεμία για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αναδεύεται σε vortex για να διαλυθεί το ίζημα. Μετά την ανάδευση σε vortex παραμένει για 10min και μετράμε την απορρόφηση (A₁) στα 510nm σε κυψελίδα μικρής στένωσης σε φασματοφωτόμετρο με λάμπα αλογόνου. Χρησιμοποιούμε ως blank TEA-SDS. Στη συνέχεια προσθέτουμε 125μL διαλύματος FeCl₃ και μετά από 10min μετράμε ξανά την απορρόφηση (A₂) στα 510nm. Υπολογισμός

αποτελεσμάτων: Υπολογίζουμε τη διαφορά $A=(A_2)-(A_1)$. Από την καμπύλη αναφοράς βρίσκουμε τη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη διαφορά των απορροφήσεων, έστω C_1 . Η τελική συγκέντρωση ταννινών είναι $C=C_1*(αραίωση)$ mg/L οίνου.

Διαλύματα*:

Model wine: 12% αιθανόλη, 5g/L τρυγικό και NaOH 1N (pH 3,3). Σε ποτήρι ζέσεως με περίπου 500mL H₂O προσθέτουμε 120mL αιθανόλη και 5g/L τρυγικό και αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί. Γίνεται διόρθωση του pH στο 3,3 με NaOH 1N, και συμπληρώνουμε τον όγκο σε ογκομετρική φιάλη στο 1L με H₂O. Διάλυμα A: 200mM οξικού οξέος, 170mM NaCl και NaOH (pH 4,9). Σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο υπάρχουν περίπου 150mL H₂O προσθέτουμε 2,4g οξικού οξέος και 1,98 g NaCl αναδεύουμε μέχρι να διαλυθούν και γίνεται διόρθωση του pH με NaOH 1N ώστε να ισούται με 4,9. Συμπληρώνουμε τον όγκο σε ογκομετρική φιάλη στα 200mL με H₂O. Πρωτεϊνικό διάλυμα με Bovine Serum Albumin (BSA-fraction V): διάλυμα A με BSA 1g/L. Σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο υπάρχει μικρή ποσότητα διαλύματος A προσθέτουμε 100mg BSA, αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί και συμπληρώνουμε τον όγκο σε ογκομετρική φιάλη στα 100mL με διάλυμα A. Διάλυμα Triethanolamine (TEA) - Sodium Dodecyl Sulfate (SDS): 5% TEA (v/v) και 10% SDS (w/v). Σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο υπάρχει μικρή ποσότητα H₂O προσθέτουμε 5mL TEA, 10g SDS αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί. Το διάλυμα αφρίζει, παραμένει μία μέρα και συμπληρώνουμε τον όγκο σε ογκομετρική φιάλη στα 100mL με H₂O.

Διάλυμα FeCl₃: 10mM FeCl₃ σε 0,01N HCl. Σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο υπάρχει μικρή ποσότητα H₂O προσθέτουμε 0,083ml πυκνού HCl 37%, 270mg ένυδρου FeCl₃ αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί και συμπληρώνουμε τον όγκο σε ογκομετρική φιάλη στα 100mL με H₂O.

Μητρικό διάλυμα κατεχίνης: 1g/L – σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο υπάρχει μικρή ποσότητα H₂O προσθέτουμε 10mL αιθανόλη, 100mg κατεχίνης αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί και συμπληρώνουμε τον όγκο σε ογκομετρική 100mL με H₂O.

Καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης: Για την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα κατεχίνης 50 έως 300mg/L (πίνακας 3).

Πίνακας 3. Διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία της καμπύλης κατεχίνης

Συγκέντρωση κατεχίνης	Διάλυμα κατεχίνης	Διάλυμα TEA-SDS	Διάλυμα FeCl ₃	Συνολικός όγκος
25mg/L	25μL	850μL	125μL	1mL
50mg/L	50μL	825μL	125μL	1mL
100mg/L	100μL	775μL	125μL	1mL
150mg/L	150μL	725μL	125μL	1mL
200mg/L	200μL	675μL	125μL	1mL
250mg/L	250μL	625μL	125μL	1mL
300mg/L	300μL	575μL	125μL	1mL

Τα διαλύματα που δημιουργούνται αναδεύονται (vortex) και παραμένουν κλειστά, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10λεπτά. Παίρνουμε τις απορροφήσεις στα 510nm. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων:** Από την καμπύλη αναφοράς βρίσκουμε τη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη διαφορά των απορροφήσεων, έστω C_1 . Η τελική συγκέντρωση ταννινών είναι $C=C_1*(\text{αραίωση})$ mg/L οίνου.

5.2.13 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose σε οίνους

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 2 πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου. Στον πρώτο, ο οποίος χρησιμεύει ως δείγμα αναφοράς (control sample), προστίθενται 250μL οίνου, 2ml διαλύματος θεικού αμμώνιο και συμπληρώνουμε με νερό, ώστε να έχουμε τελικό όγκο 10mL. Γίνεται ανάδευση με vortex και το διάλυμα παραμένει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στον δεύτερο σωλήνα (treatment sample) προστίθενται 250μL οίνου και 3ml διαλύματος methyl cellulose και αφού γίνει ανάδευση σε vortex το διάλυμα παραμένει για 2-3min. Στη συνέχεια προστίθενται 2ml διαλύματος θεικού αμμώνιο και 4ml νερό, ώστε να έχουμε τελικό όγκο 10mL. Γίνεται ανάδευση με vortex και το διάλυμα παραμένει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 4000 (rpm) στροφές και μετρώνται οι απορροφήσεις στα 280nm των A_c (δείγμα αναφοράς) και A_t . Οι απορροφήσεις μετρώνται αμέσως μόλις τα δείγματα φυγοκεντρηθούν. Υπολογίζεται η διαφορά των απορροφήσεων στα 280nm, ($A_{280} = A_c - A_t$) και στη συνέχεια μετατρέπεται σε mg/L κατεχίνης μέσω της καμπύλης αναφοράς σε κατεχίνη (C_{Tannin}). Συγκέντρωση ταννινών σε οίνο (mg/L) = (C_{Tannin}) x 40

Καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης

Η καμπύλη αναφοράς δημιουργείται με διαλύματα 10 έως 200mg/L κατεχίνης. Μετράται η απορρόφηση στα 280 nm των διαλυμάτων κατεχίνης με συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 150 και 200 mg/L. Τα διαλύματα προκύπτουν με προσθήκη αντίστοιχα 100μL, 500μL, 1ml, 1,5ml και 2 mL του διαλύματος κατεχίνης 1g/L σε τελικό όγκο 10mL με H₂O.

Διαλύματα*:

A. Διάλυμα αιθανόλης 50%: σε ογκομετρική φιάλη προσθέτουμε 50 mL αιθανόλης και συμπληρώνουμε με H₂O μέχρι τα 100 mL.

B. Κορεσμένο διάλυμα θεικής αμμωνίας : σε ντουράν των 500mL προσθέτουμε 300 mL H₂O και ρίχνουμε κρυστάλλους θεικού αμμωνίου σε συνεχή ανάδευση, μέχρι να μην μπορεί να διαλυθεί άλλο. Συνεχίζουμε να προσθέτουμε μέχρι να υπάρχουν στον πάτο περίπου 1,5cm κρύσταλλοι θεικής αμμωνίας. Διατηρείται για περίπου 6 μήνες. Αν οι κρύσταλλοι λιγосτεύουν προσθέτουμε και άλλους.

Γ. Διάλυμα 0,04% methyl cellulose : θερμαίνουμε περίπου 300mL απιονισμένο H₂O στους 80 °C και παγώνουμε περίπου 700mL απιονισμένο H₂O στους 0-5°C. Σε μεγάλο ποτήρι ζέσεως βάζουμε τα 300mL απιονισμένο H₂O στους 80°C και προσθέτουμε 0,4g methyl cellulose μέχρι να διαλυθεί τελείως με συνεχή ανάδευση. Αν το πολυμερές κολλήσει στα

τοιχώματα παίρνουμε ζεστό νερό με μια πιπέτα και ρίχνουμε σε αυτά. Το βάζουμε σε υδατόλουτρο 0-5°C και προσθέτουμε αργά το κρύο H₂O για 20-40 min αναδεύοντάς το. Το βγάζουμε από το υδατόλουτρο και το αφήνουμε για ανάδευση όλο το βράδυ.

Δ. Διάλυμα κατεχίνης 1g/L: σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο υπάρχει μικρή ποσότητα H₂O προσθέτουμε 10mL αιθανόλη, 100mg κατεχίνης αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί και συμπληρώνουμε τον όγκο σε ογκομετρική 100mL με H₂O.

5.2.14 Προσδιορισμός ανθοκυανών με HPLC

Ποσότητα του δείγματος φιλτράρεται με 0,2μm φίλτρο πριν την ανάλυση. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Τοποθετούνται σε κατάλληλους περιέκτες για αυτόματο δειγματολήπτη. Αρχικά, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα της υπό μελέτη ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις και αναλύονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες με το άγνωστο δείγμα. Έπειτα, κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, όπου η συγκέντρωση της ουσίας είναι συνάρτηση του εμβαδού της κορυφής της. Από την καμπύλη αυτή και μετρώντας το εμβαδόν της κορυφής της άγνωστης ουσίας βρίσκεται η ποσότητά της στο δείγμα. Για την ποσοτική ανάλυση των ανθοκυανών κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη του μονογλυκοζίτη -3 της μαλβιδίνης και όλες οι ανθοκυάνες εκφράστηκαν ως προς την μαλβιδίνη σε mg/L οίνου. Ακολουθεί ταυτοποίηση, η οποία γίνεται βάση πρότυπων ουσιών των ανθοκυανών, συγκρίνοντας τους χρόνους συγκράτησης (t_R). Το δείγμα οίνου που χρησιμοποιείται φιλτράρεται με φίλτρο 0,2μm πριν τη χρωματογραφία. Οι ανθοκυάνες που ταυτοποιήθηκαν είναι οι :

- κυανιδίνη
- δελφινιδίνη
- πετουνιδίνη
- παιονιδίνη
- μαλβιδίνη
- οξικός εστέρας μαλβιδίνης
- κουμαρικός εστέρας μαλβιδίνης

Για την παρούσα μελέτη ο εξοπλισμός του οργάνου HPLC αποτελείται από:

- αντλία Jasco PU-980,
- στήλη Nova-Pack C₁₈, διαστάσεων 250 x 47,6 mm και διαμέτρου 4μm,
- ανιχνευτή υπεριώδους - ορατού πολλαπλής δέσμης (diode array).

Η κινητή φάση αποτελείται από τον διαλύτη Α (υδατικό διάλυμα 10% v/v μυρμηγκικού οξέος) και τον διαλύτη Β (μεθανόλη). Ο ρυθμός ροής είναι 1mL/min με όγκο δείγματος 10μL (αυτόματη έγχυση), ανίχνευση στα 520nm και το πρόγραμμα έκλουσης είναι το εξής:

- 95% διαλύτης Α για 1min
- από 95% διαλύτη Α σε 50% σε διάστημα 26 min
- από 50% διαλύτη Α σε 5% σε διάστημα 29 min, όπου διατηρήθηκε ισοκρατικά για επιπλέον 3 min. (Kallithraka et al, 2005).

5.2.15 Εκτίμηση ελλαγικών ταννινών με HPLC

Αρχικά 50ml δείγματος οίνου, τα οποία δεν είναι απαραίτητο να φυγοκεντρηθούν, εξατμίζονται υπό κενό στους 50°C με τη χρήση συσκευής περιστροφικού αποστακτήρα (rotary evaporation) μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε μικρή ποσότητα MeOH, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 20 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με MeOH. Το αιώρημα μπαίνει σε λουτρό υπερήχων για 10 min. Για τον μάρτυρα, μεταφέρονται 2mL δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 5mL, και ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με MeOH. Για το δείγμα, τοποθετούνται από το αιώρημα σε 2 σωλήνες rytex με πόμα από teflon (ο ένας χρησιμοποιείται ως επανάληψη) από 4ml στον καθένα και προστίθενται από 1mL πυκνό HCL 37%. Οι σωλήνες παραμένουν σε ελαιόλουτρο στους 100°C για 2 ώρες. Στο τέλος, αφού κρυώσουν, το κάθε δείγμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10mL και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με MeOH. Στο τέλος, ακολουθεί φιλτράρισμα των τριών παραπάνω δειγμάτων με φίλτρο σύριγγας 0,2μm, τοποθέτηση σε φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη για HPLC και ακολουθεί η χρωματογραφία. Η ταυτοποίηση του ελλαγικού οξέος γίνεται βάση πρότυπης καμπύλης συγκρίνοντας τον χρόνο συγκράτησης (Viriot et al, 1994). Η στήλη της HPLC είναι Pinnacle II C18 (5 μm, 4.6x250mm) (Restek). Η κινητή φάση αποτελείται από τον διαλύτη A (υδατικό διάλυμα 0,4% μυρμηγκικού οξέος) και τον διαλύτη B (διάλυμα 0,4% μυρμηγκικού οξέος σε μεθανόλη). Ο ρυθμός ροής είναι 1mL/min με όγκο δείγματος 20μL (αυτόματη έγχυση), ανίχνευση στα 370nm και το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης (Πίν. 4) είναι το εξής:

Πίνακας 4. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης HPLC

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (0,4% μυρμηγκικό οξύ σε dH ₂ O)	Διαλύτης B (0,4% μυρμηγκικό οξύ σε MeOH)
αρχικές συνθήκες	100	0
1	99	1
5	65	35
30	55	45
35	0	100
40	0	100
44	100	0

Για τη βαθμονόμηση παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα ελλαγικού οξέος 100 mg/L σε οξινισμένη μεθανόλη (διαλύτης B) και αραιώνεται ως εξής σε τελικό όγκο 1 mL (Πίν. 5).

Πίνακας 5. Βαθμονόμηση HPLC για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης ελλαγικού οξέος

Τελική συγκέντρωση ελλαγικού οξέος	Πρότυπο διάλυμα ελλαγικού οξέος μL	Διαλύτης B (0,4% φορμικό οξύ σε MeOH) μL
------------------------------------	------------------------------------	--

(mg/L)		
2	20	980
5	50	950
10	100	900
20	200	800

Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις του ελλαγικού με το εμβαδό των κορυφών που προκύπτουν από την HPLC κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη και από την ευθεία που την περιγράφει υπολογίζεται η συγκέντρωση του ελλαγικού στα δείγματα του κρασιού αφού αφαιρεθεί η συμμετοχή του μάρτυρα του κάθε δείγματος (τροποποιημένη μέθοδος Chira and Teissedre, 2013).

5.2.16 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – μέθοδος DPPH

Σε erpendorf προστίθενται 25μL αραιωμένου δείγματος οίνου (από 1/10 έως 1/20 αραιώση ανάλογα με την συγκέντρωση των φαινολικών με απιονισμένο H₂O) και 975 μL μητρικού διαλύματος DPPH. Μετά την ανάδευση σε vortex για 30 δευτερόλεπτα μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 515nm (t=0) σε κυψελίδες με στένωση και λάμπα αλογόνου. Από τις δύο απορροφήσεις υπολογίζεται η επί της εκατό (%) διαφορά στην απορρόφηση:

$\% \Delta A (515) = [[A(0) - A(30)] / A(0)] \times 100$, και μέσω της καμπύλης εκφράζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα σε mM trolox. Έστω C η τιμή από την καμπύλη αναφοράς, τότε **αντιοξειδωτική ικανότητα δείγματος = C * (αραίωση mM trolox)**.

Καμπύλη αναφοράς σε trolox

Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς παρασκευάζεται διάλυμα trolox με συγκέντρωση 2mM (διάλυμα A). Η καμπύλη αναφοράς γίνεται για τις συγκεντρώσεις 0.08, 0.5, 1, 1.5, 2 mM trolox. Σε ογκομετρικές φιάλες των 5ml προστίθενται οι ανάλογες ποσότητες 0.2, 1.25, 2.5, 3.75 ml διαλύματος A και ο όγκος συμπληρώνεται με καθαρή αιθανόλη (πίνακας 6).

Πίνακας 6. Συγκέντρωση trolox και διαλύματος A για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης

Διαλύματα	Τελική συγκέντρωση trolox σε mM	Ποσότητα δ/τος A
1	0,08	0,2 ml
2	0,5	1,25 ml
3	1	2,5 ml
4	1,5	3,75 ml
5	2	διάλυμα A χωρίς αραιώση

Σε erpendorf προστίθενται 25μL του κάθε διαλύματος trolox και 975 μL μητρικού διαλύματος DPPH. Μετά την ανάδευση σε vortex για 30 δευτερόλεπτα μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 515nm (t=0) σε κυψελίδες με στένωση και λάμπα αλογόνου. Μετά από 30 λεπτά μετράται η απορρόφηση ξανά (t=30). Το φωτόμετρο μηδενίζεται με απιονισμένο H₂O. Από τις δύο απορροφήσεις υπολογίζεται η % διαφορά στην απορρόφηση:

$$\% \Delta A (515) = [A(0) - A(30)/A(0)] \times 100$$

Η καμπύλη αναφοράς γίνεται μεταξύ των συγκεντρώσεων trolox και της % διαφορά στην απορρόφηση.

Διαλύματα*:

Μητρικό διάλυμα DPPH: 5,9mg DPPH σε 250ml μεθανόλης. Το διάλυμα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως, διατηρείται στο ψυγείο μόνο μία μέρα.

Διάλυμα A (2mM trolox): 12,5mg trolox διαλύονται σε 25ml 12% αιθανόλης

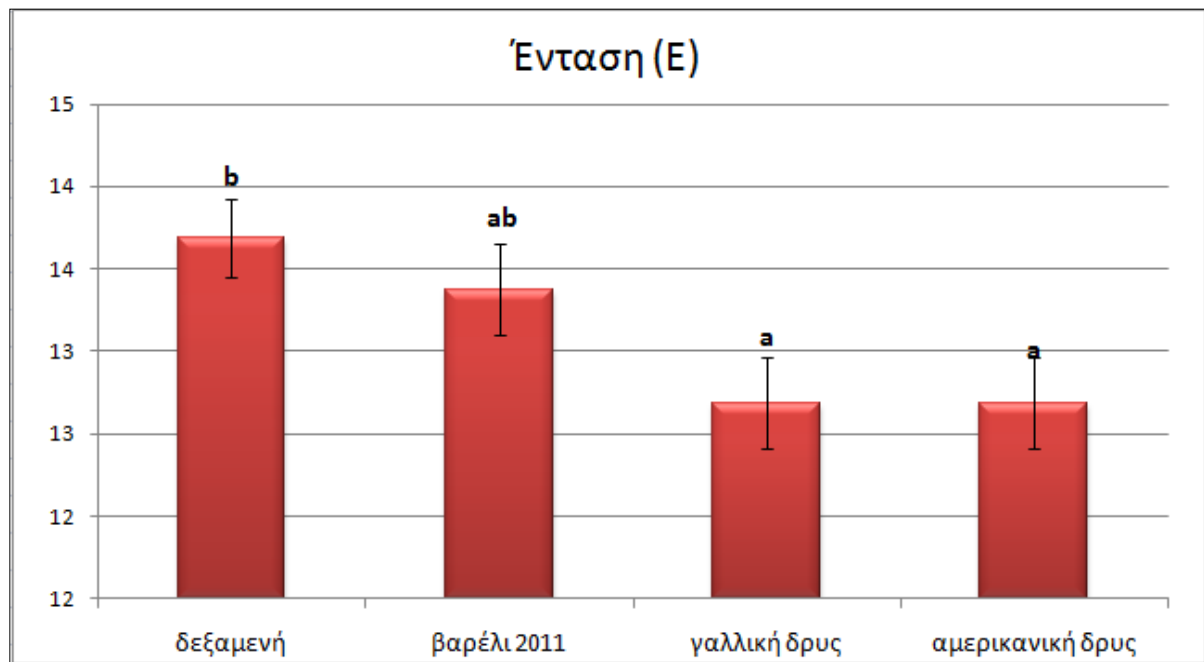
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά μετρήθηκε ο αλκοολικός τίτλος, η ογκομετρούμενη οξύτητα και το pH σε όλα τα δείγματα χωρίς να παρουσιάζονται διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, καθώς η επαφή με το ξύλο δεν φαίνεται να επηρεάζει την οξύτητα και την περιεχόμενη αλκοόλη. Τα αποτελέσματα των εν λόγω μετρήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7. Τιμές αλκοολικού τίτλου, ογκομετρούμενης οξύτητας και pH των τεσσάρων δειγμάτων

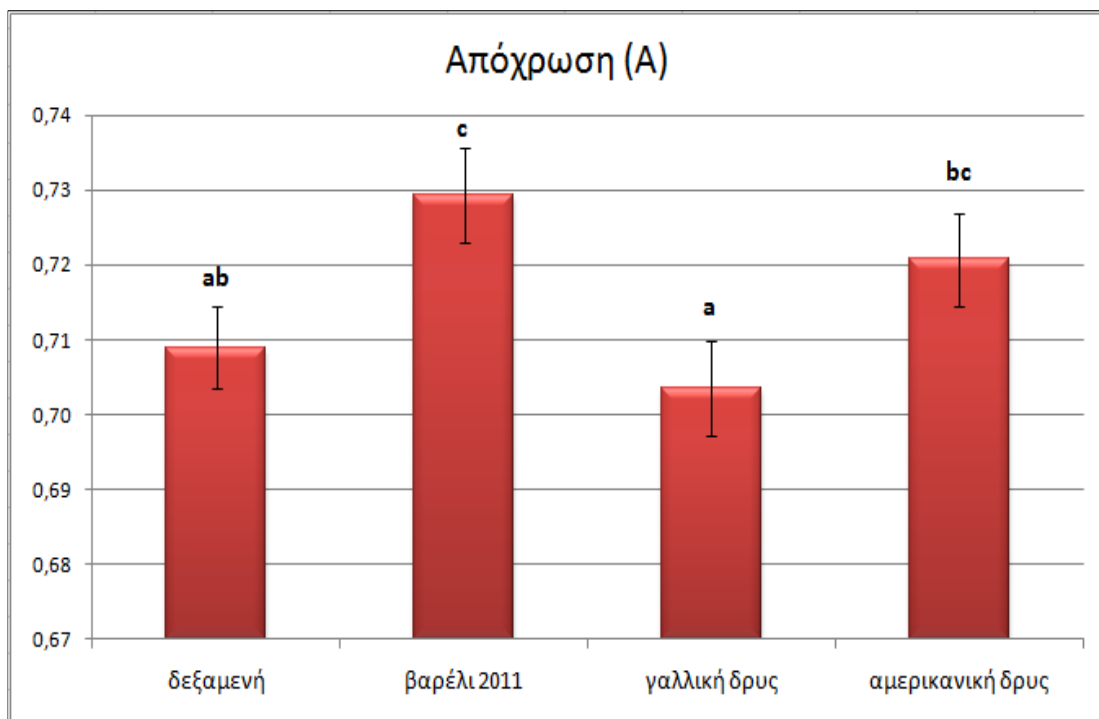
Δείγμα	αλκοολικός τίτλος % vol	ογκ. οξύτητα (g/L) τρυγικού οξέος	pH
δεξαμενή-μάρτυρας	13,68	4,95	3,45
βαρέλι 2011	13,68	4,95	3,50
γαλλική δρυς	13,60	5,00	3,42
αμερικάνικη δρυς	13,60	5,00	3,42

6.1 Ένταση – Απόχρωση



Εικόνα 22. Ένταση χρώματος οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

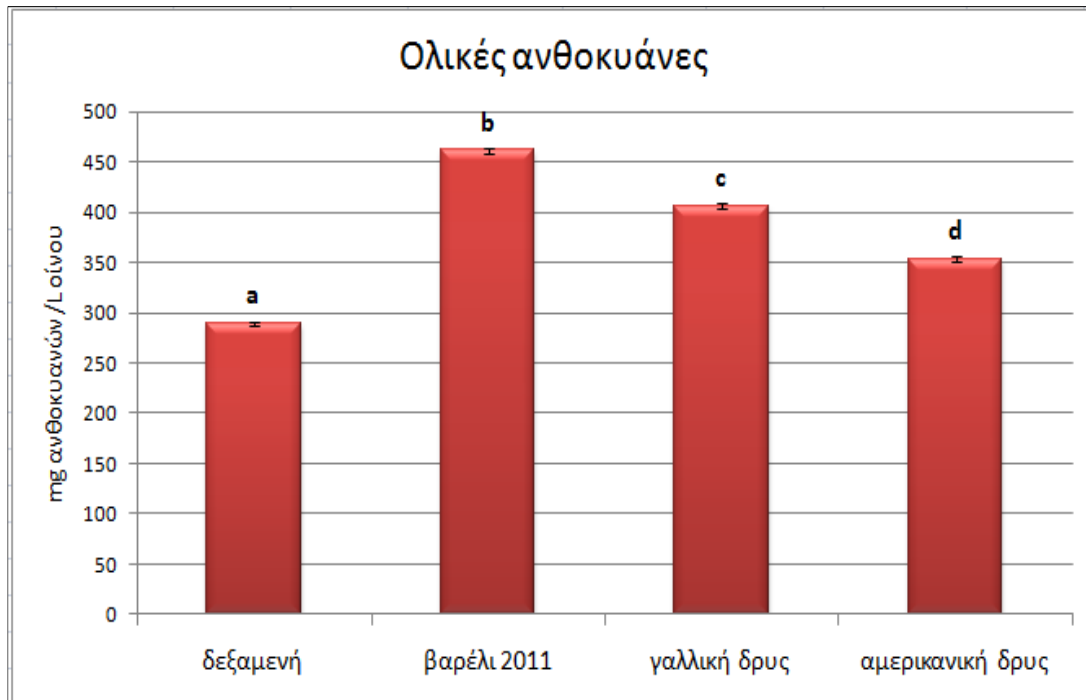
Στα παραπάνω γραφήματα παρουσιάζεται η ένταση του χρώματος των δειγμάτων κάθε επέμβασης (Εικόνα 22). Η δεξαμενή που χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας παρουσίασε τις μεγαλύτερες τιμές έντασης χρώματος (13,69) σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, έχοντας στατιστική διαφορά από την γαλλική (12,69) και την αμερικανική δρυς (12,69) αλλά όχι από το παλιό βαρέλι (13,37) του 2011, το οποίο με τη σειρά του δεν είχε στατιστική διαφορά από την γαλλική και την αμερικανική δρυς. Η γαλλική και η αμερικανική δρυς δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Η υψηλή τιμή του δείγματος της δεξαμενής δείχνει ότι το χρώμα οφείλεται κυρίως στις ανθοκυάνες, ενώ στα δείγματα που έχουν έρθει σε επαφή με το ξύλο του βαρελιού πιθανόν έχουν αρχίσει να εμπλέκονται και οι ταννίνες, ειδικά στα καινούρια βαρέλια γαλλικής και αμερικανικής δρυός, καθώς στο παλιό βαρέλι ποσότητα αυτών έχει εκχυλιστεί μειώνοντας έτσι την επίδραση τους στην ένταση του χρώματος. Οι τιμές της έντασης χρώματος βιβλιογραφικά κυμαίνονται από 3 ως 18. Η χαμηλότερη τιμή των δειγμάτων ήταν 12,69 που θεωρείται σχετικά υψηλή.



Εικόνα 23. Απόχρωση οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Οι αναλύσεις (Εικόνα 23) έδειξαν ότι τη μεγαλύτερη απόχρωση εμφάνισε το παλαιό βαρέλι (0,73), ενώ τη μικρότερη η γαλλική δρυς (0,70) και η δεξαμενή (0,71). Η απόχρωση του δείγματος παλαιού βαρελιού δεν παρουσιάζει στατιστική διαφορά με την αμερικανική δρυς, η οποία με τη σειρά της δεν παρουσιάζει στατιστική διαφορά με το δείγμα της δεξαμενής. Το δείγμα της δεξαμενής δεν παρουσιάζει στατιστική διαφορά με την γαλλική δρυς. Οι νέοι οίνοι παρουσιάζουν τιμές απόχρωσης μεταξύ 0.5 – 0.7 που αυξάνονται κατά την παλαίωση, φθάνοντας σε ένα ανώτερο όριο, περίπου 1.2-1.3 (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982, Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Κουράκου, 1998). Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι τιμές απόχρωσης συμφωνούν με την ηλικία του οίνου (τρύγος 2013) καθώς είναι σχετικά νέος για ερυθρός ξηρός οίνος.

6.2 Ολικές ανθοκυάνες



Εικόνα 24. Συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών οίνων (mg ανθοκυανών/L οίνου) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, d, είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Τα αποτελέσματα προσδιορισμού των ολικών ανθοκυανών παρουσιάζονται στην εικόνα 24, όπου φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, ενώ τη μεγαλύτερη τιμή σε ολικές ανθοκυάνες εμφανίζει το δείγμα του παλαιού βαρελιού (461,12 mg ανθοκυανών/L), ακολουθεί η γαλλική δρυς (406,15 mg ανθοκυανών/L), η αμερικανική (353,23 mg ανθοκυανών/L) και την μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζει το δείγμα της δεξαμενής (289,49 mg ανθοκυανών/L). Οι τιμές των ολικών ανθοκυανών σε συνδυασμό με την ένταση χρώματος και τον δείκτη HCl, όπως φαίνονται στον πίνακα 8, μαρτυρούν την έκθεση του δείγματος της δεξαμενής στο οξυγόνο σε μεγαλύτερο βαθμό από τη μικροοξυγόνωση που υπόκεινται τα δείγματα των βαρελιών. Σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξαν και οι Moutounet et al., (1996) όπως φαίνεται στον πίνακα 9, καθώς και οι Ribereau-Gayon et al., (1983) σε πειράματα μικροοξυγόνωσης και νέων βαρελιών όπως φαίνεται στον πίνακα 10. Η μείωση της συγκέντρωσης ανθοκυανών οφείλεται σε αντιδράσεις αποικοδόμησης και σταθεροποίησης, καθώς και σε αλλαγές στη δομή τους. Το συμπέρασμα είναι ότι η παρουσία οξυγόνου αυξάνει την ένταση χρώματος, μειώνει συνήθως τη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών και παρουσιάζει υψηλότερες τιμές στο δείκτη HCl. Αυτή η συσχέτιση φαίνεται συγκρίνοντας τους πίνακες 8 και 9.

Πίνακας 8. Σύγκριση του χρώματος και της κατάστασης πολυμερισμού των ταννινών για όλα τα δείγματα.

Δείγμα	Ένταση (E)	Απόχρωση (A)	ανθοκυάνες (mg/l)	$\Delta\text{HCl}\%$
δεξαμενή	13,69	0,71	289	52,5

Παλαιό βαρέλι	13,37	0,73	461	47,4
γαλλική δρυς	12,69	0,70	406	45,4
αμερικάνικη δρυς	12,69	0,72	353	34,4

Πίνακας 9. Αλλαγές στο φαινολικό δυναμικό ερυθρού οίνου (Madiran wine) μετά από 5 μήνες μικροοξυγόνωσης σε δύο διαφορετικές δόσεις (Moutounet et al., 1996).

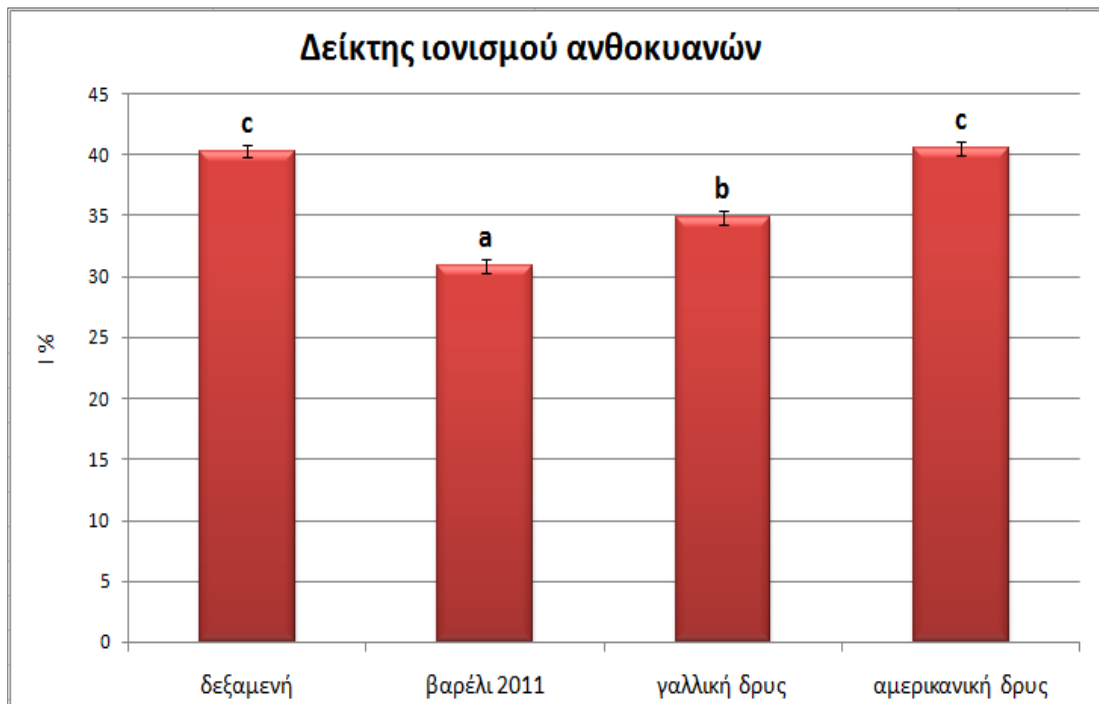
	Ένταση (E)	Απόχρωση (A)	ανθοκυάνες (mg/l)	ΔHCl%
Μάρτυρας	0.82	0.67	612	20
1 ml/l/month	1.07	0.62	566	25
3 ml/l/month	1.67	0.59	417	39

Πίνακας 10. Χρωματικές αλλαγές σε ερυθρό οίνο ανάλογα με τις συνθήκες αερισμού (Ribereau-Gayon et al., 1983).

Χρόνος (μήνες)	Ένταση (E)			ανθοκυάνες (mg/l)			PVPP	
	0	10	16	0	10	16	10	16
Μη-αεριζόμενη δεξαμενή	0.66	0.67	0.63	500	380	340	29	34
Αεριζόμενη δεξαμενή	0.66	0.72	0.72	500	300	240	37	45
Καινούριο δρύινο βαρέλι	0.66	0.83	0.75	500	280	240	42	47

Η ένταση του χρώματος είναι σαφώς αυξημένη με τον αερισμό, αν και οι τιμές των ανθοκυανών παρουσιάζουν μείωση (Ribereau-Gayon, 2006). Επίσης, ο δείκτης που προσδιορίζει την κατάσταση πολυμερισμού των ταννινών παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές στον αερισμό.

6.3 Δείκτης ιονισμού



Εικόνα 25. Δείκτης ιονισμού οίνων I% (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Ο Δείκτης Ιονισμού (I%) προσδιορίζει το ποσοστό των ελεύθερων και ενωμένων ανθοκυανών που μετέχουν στη δημιουργία του χρώματος των οίνων, δηλαδή των ανθοκυανών που βρίσκονται στην έγχρωμη μορφή σε σχέση με τις ολικές ανθοκυάνες. Για τους φρέσκους οίνους κυμαίνεται μεταξύ 10 - 30%. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι τιμές του I% κυμαίνονται από 30,90 έως 40,51, ανάλογα με την επέμβαση. Καθώς οι Δείκτες Ιονισμού (Εικόνα 25) δεν παρουσιάζουν στατιστική διαφορά, αναμένεται οι οίνοι που παρουσιάζουν μεγάλες τιμές ολικών ανθοκυανών να παρουσιάζουν αντίστοιχα και μεγάλες τιμές έντασης. Το δείγμα της δεξαμενής παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό ιονισμού ανθοκυανών (40,51 %), ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει και την μεγαλύτερη τιμή έντασης χρώματος. Το συγκεκριμένο δείγμα δεν παρουσιάζει στατιστική διαφορά από την αμερικανική δρυς, αλλά έχει στατιστική διαφορά από τα άλλα δύο δείγματα. Το δείγμα του παλαιού βαρελιού (30,90 %) παρουσιάζει στατιστική διαφορά από όλα τα υπόλοιπα δείγματα καθώς και την χαμηλότερη τιμή. Τέλος η γαλλική δρυς διαφέρει σημαντικά από όλα τα δείγματα και έχει ποσοστό 34,87 %. Υψηλός δείκτης ιονισμού αντιστοιχεί σε υψηλή ένταση χρώματος όπως συμβαίνει στα εξεταζόμενα δείγματα. Οι τιμές του δείκτη ιονισμού είναι αρκετά υψηλές για νέους οίνους (2013), γεγονός που οφείλεται στα σύμπλοκα των ταννινών με κατιόντα φλαβυλίου.

Μια πιο λεπτομερής ανάλυση καθιστά δυνατή τη διάκριση μεταξύ της συγκέντρωσης ελεύθερων ανθοκυανών (AI) και αυτών που έχουν ενωθεί με τις ταννίνες (T-A). Πολλαπλασιάζοντας κάθε μία από αυτές τις τιμές με το δείκτη ιονισμού δείχνει το ποσοστό

του κάθε τύπου μορίου σε έγχρωμο μορφή. Έχει παρατηρηθεί ότι η πτώση της συγκέντρωσης των ανθοκυανών λόγω του αερισμού πλήττει κυρίως τις ελεύθερες μορφές (Ribereau-Gayon et al., 1983). Οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών σε συνδυασμό με ταννίνες παραμένουν σταθερές, και το ποσοστό αυτών των μορίων που βρίσκονται σε έγχρωμη μορφή αυξάνεται σταδιακά με τον αερισμό (πίνακας 11). Το συνολικό αποτέλεσμα είναι η μείωση των ολικών ανθοκυανών, αλλά ο αριθμός των μορίων έγχρωμης μορφής αυξάνεται, προκαλώντας αύξηση στην ένταση του χρώματος. Επιπλέον, αυτή η εξέλιξη των συνδυασμένων μορφών τείνει να σταθεροποιήσει το χρώμα. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν και τα δείγματα των βαρελιών σε σχέση με αυτό της δεξαμενής όπως φαίνεται στον πίνακα 12, με τις τιμές των έγχρωμων ανθοκυανών για τα βαρέλια να παρουσιάζουν σημαντική διαφορά από το δείγμα τις δεξαμενής και παρόμοιες τιμές μεταξύ τους.

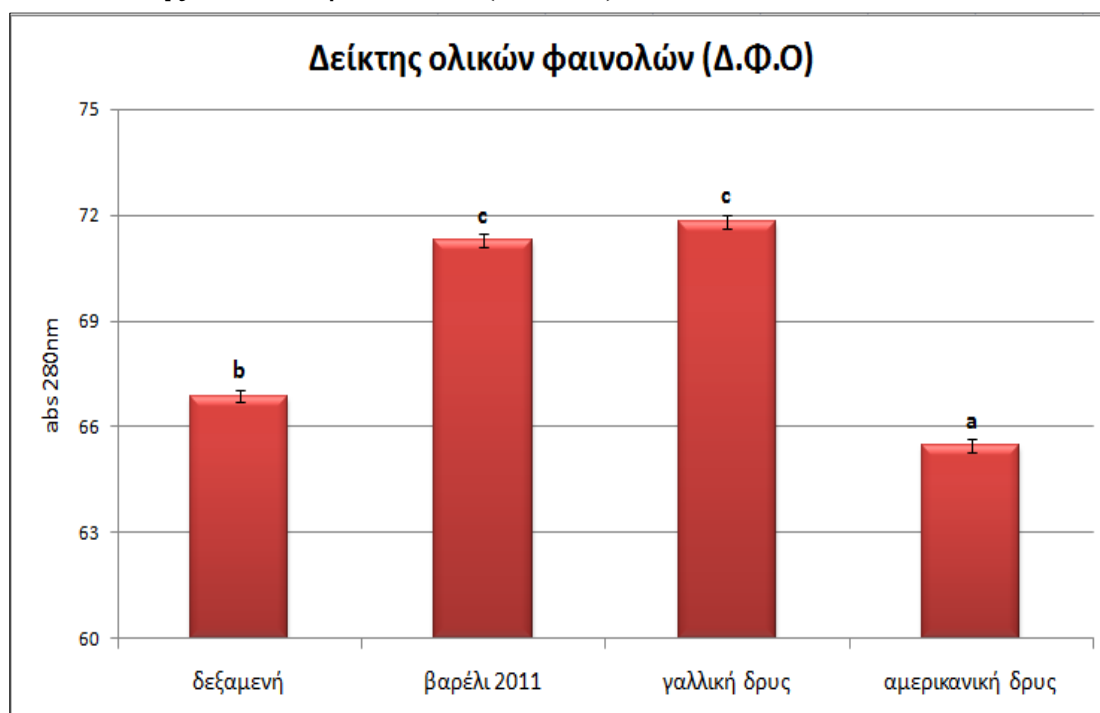
Πίνακας 11. Είδη ανθοκυανών που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης (συνέχεια πειράματος του πίνακα 10) (Ribereau-Gayon et al., 1983).

Σύνολο ελεύθερων και ενωμένων ανθοκυανών(mg/l)	έγχρωμες	άχρωμες	σύνολο
Μη-αεριζόμενη δεξαμενή	76	304	380
Αεριζόμενη δεξαμενή	96	204	300
Καινούριο δρύινο βαρέλι	112	168	280

Πίνακας 12. Σύνολο έγχρωμων και άχρωμων ανθοκυανών.

	Έγχρωμες ανθοκυάνες	Άχρωμες ανθοκυάνες	σύνολο
δεξαμενή	117	173	290
βαρέλι 2011	142	319	461
γαλλική δρυς	142	265	407
αμερικάνικη δρυς	143	210	353

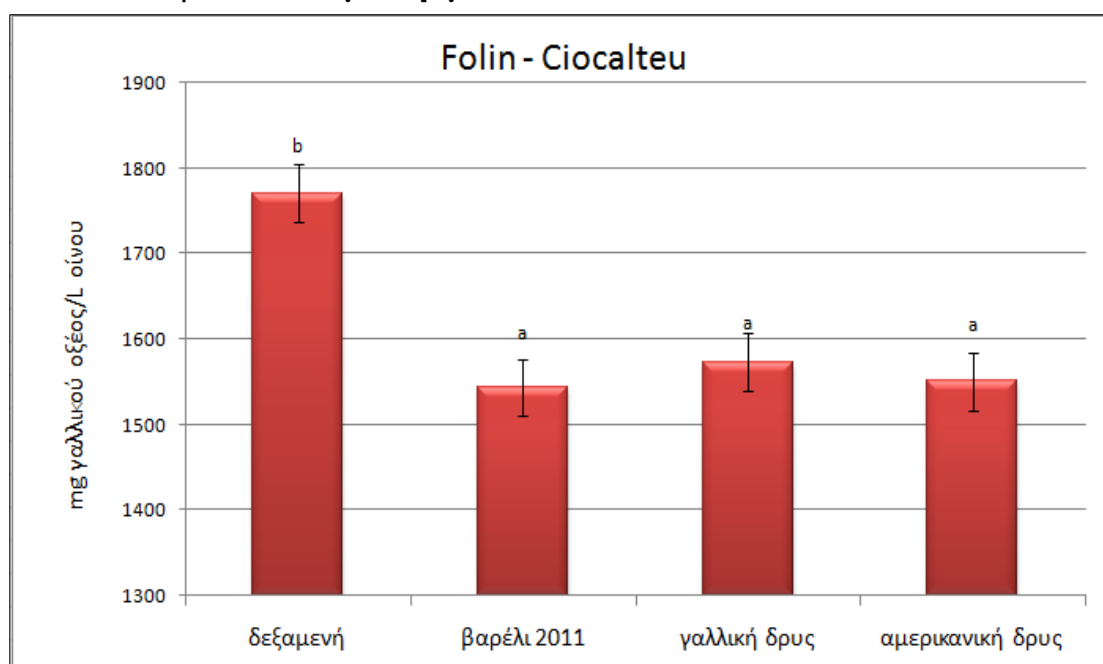
6.4 Δείκτης ολικών φαινολών (Δ.Φ.Ο.)



Εικόνα 26. Δείκτης φαινολικών ουσιών οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Ο Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) αξιοποιεί την ισχυρή απορρόφηση βενζολικών δακτυλίων στα 280 nm και αποτελεί την απλούστερη, ταχύτερη και επαναληψιμότερη μέθοδο εκτίμησης της περιεκτικότητας των φαινολικών συστατικών που περιέχει ένας οίνος, στο σύνολο τους, χωρίς δηλαδή να δίνει πληροφορίες για συγκεκριμένη κατηγορία φαινολικών ουσιών. Όπως φαίνεται από το Εικόνα 26 οι τιμές του δείκτη κυμαίνονται μεταξύ 65 και 71,8 χωρίς να εμφανίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων του παλαιού βαρελιού και της γαλλικής δρυός, αλλά με σημαντική διαφορά μεταξύ της δεξαμενής και της αμερικανικής δρυός, η οποία παρουσίασε και την χαμηλότερη τιμή από τα εξεταζόμενα δείγματα. Οι τιμές των ολικών φαινολών κρίνονται γενικά υψηλές καθώς η χαμηλότερη τιμή ήταν 65, κάτι που μπορεί να συσχετιστεί με τις υψηλές συγκεντρώσεις ολικών ταννινών (Εικόνα 28).

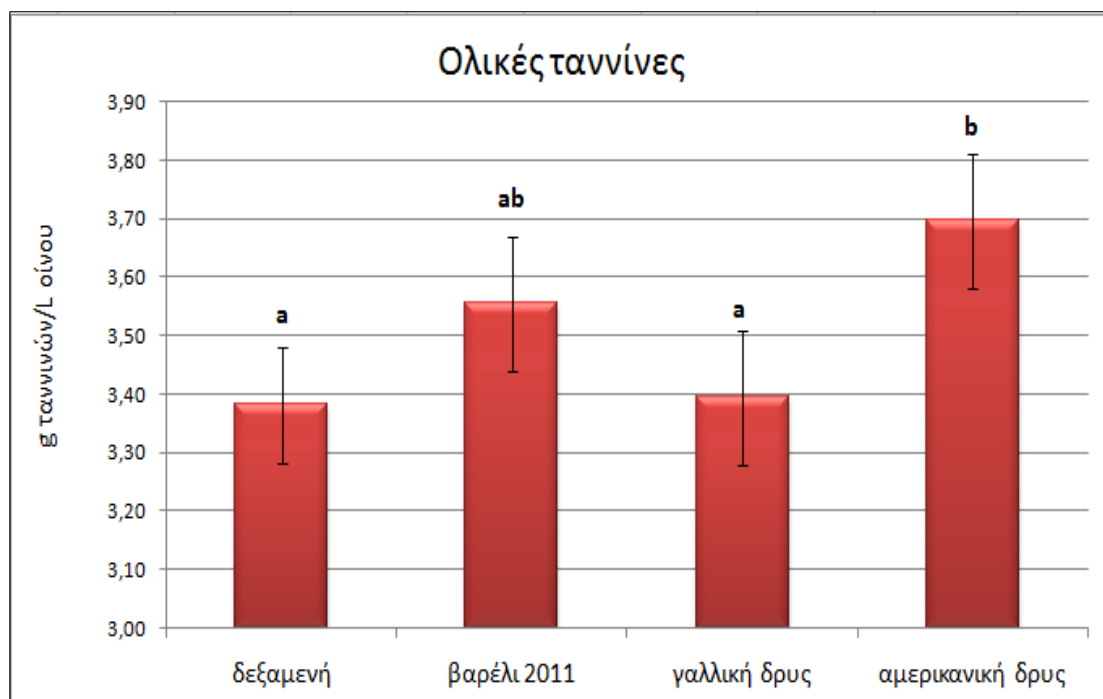
6.5 Ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu



Εικόνα 27. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών οίνων (mg γαλλικού οξέος/L οίνου) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 27 φαίνονται οι τιμές των ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, με το δείγμα της δεξαμενής (1771 mg γαλλικού οξέος/L οίνου) να παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση και σημαντικά διαφορετικές τιμές από όλα τα άλλα δείγματα, τα οποία με τη σειρά τους δεν έχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Την χαμηλότερη τιμή ολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος εμφανίζει το δείγμα παλαιού βαρελιού (1543) και ακολουθεί η αμερικανική (1551) και η γαλλική δρυς (1573). Αυτή η διαφορά μεταξύ των τιμών της δεξαμενής και των βαρελιών μπορεί να οφείλεται στην επίδραση του βαρελιού οδηγώντας σε περαιτέρω πολυμερισμό και καθίζηση ταννινών ή συμπλόκων ανθοκυανών-ταννινών.

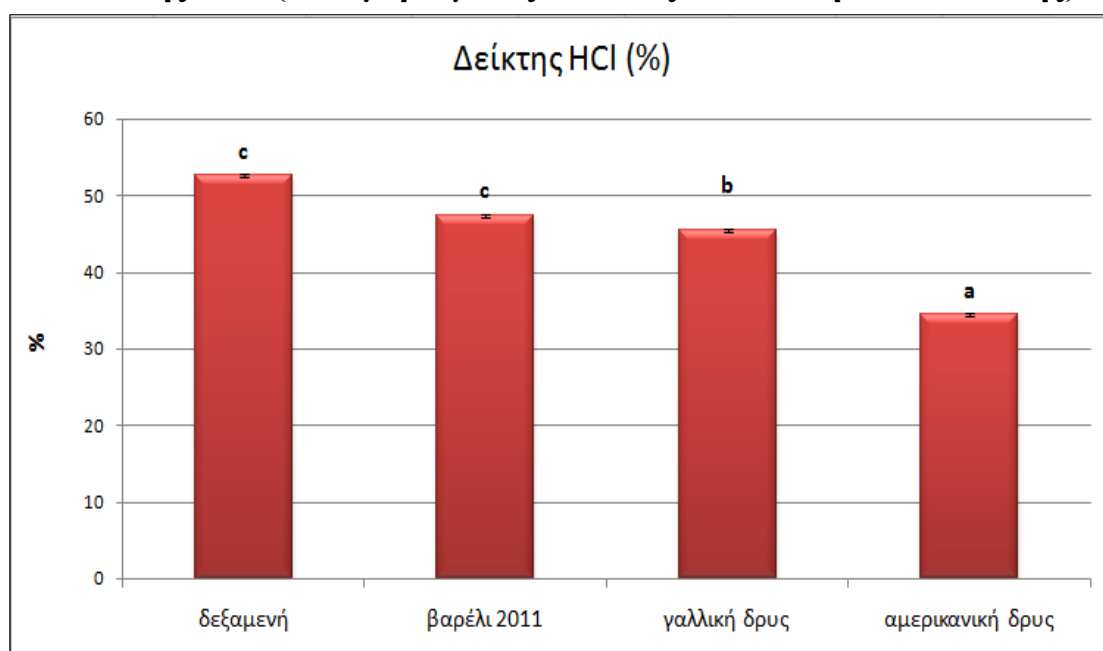
6.6 Ταννίνες με βρασμό (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες)



Εικόνα 28. Συγκέντρωση ολικών ταννινών οίνων (g/L) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 28 απεικονίζεται η συγκέντρωση ταννινών εκφρασμένη σε γραμμάρια ταννινών ανά λίτρο οίνου, με το δείγμα της αμερικανικής δρυς (3,70 g ταννινών/L οίνου) να εμφανίζει την υψηλότερη τιμή από όλα τα δείγματα και σημαντική διαφορά από τα δείγματα της δεξαμενής και της γαλλικής δρυός, τα οποία με τη σειρά τους δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους. Την δεύτερη μεγαλύτερη τιμή εμφάνισε το δείγμα του παλαιού βαρελιού (3,56) και τη χαμηλότερη τα δείγματα της δεξαμενής (3,38) και της αμερικανικής δρυός (3,39).

6.7 Δείκτης HCl (πολυμερισμένες ταννίνες – ικανότητα παλαίωσης)



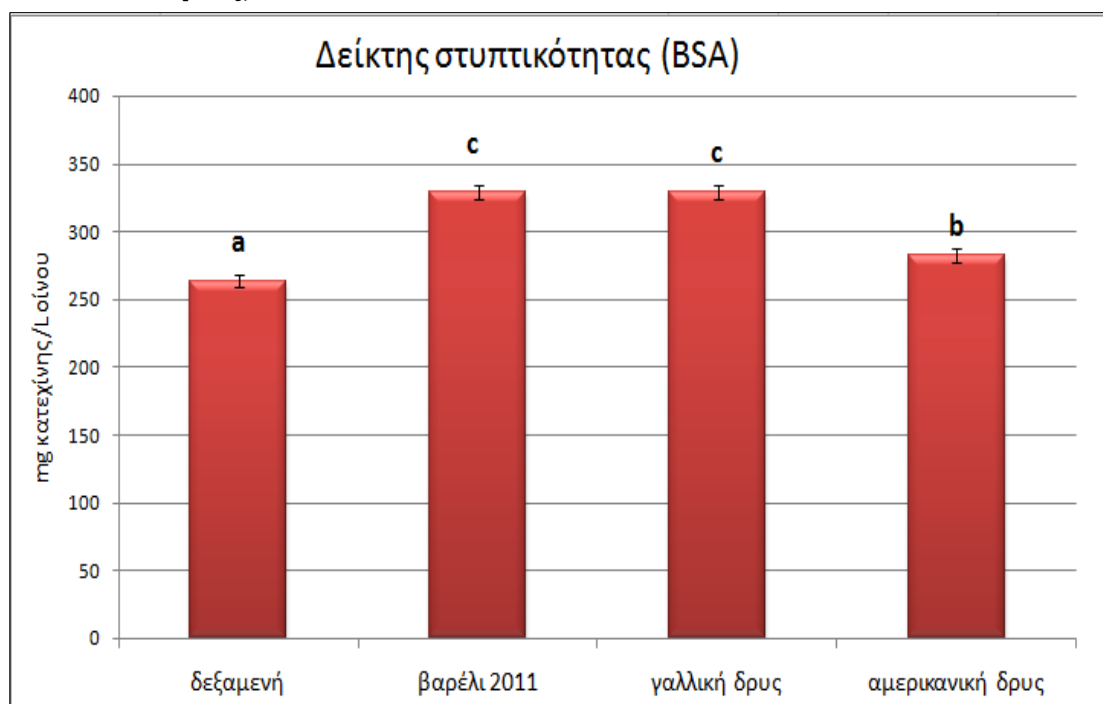
Εικόνα 29. Δείκτης υδροχλωρικού οξέος οίνων % (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Ο Δείκτης HCl δίνει πληροφορίες για την κατάσταση πολυμερισμού των ταννινών στους οίνους και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι τιμές του κυμαίνονται συνήθως μεταξύ 5 και 40%, όμως μπορεί να είναι και λίγο μεγαλύτερες όπως παρατηρείται και στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 29, τις μεγαλύτερες τιμές εμφανίζει το δείγμα της δεξαμενής (52,58 %), έχοντας μάλιστα σημαντική διαφορά από τα δείγματα της γαλλικής και της αμερικανικής δρυός, αλλά όχι από του παλαιού βαρελιού που παρουσιάζει τη δεύτερη μεγαλύτερη τιμή (47,40 %). Την μικρότερη τιμή εμφανίζει η αμερικανική δρυς (34,43 %) και ακολουθεί με σημαντική διαφορά η γαλλική δρυς (45,45 %).

Οι τιμές του δείκτη υδροχλωρικού οξέος είναι πολύ υψηλές και μεγαλύτερες του 25 % κάτι που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δείχνει υψηλή συγκέντρωση πολυμερισμένων ταννινών. Οι υψηλές τιμές (ανω του 25 %) των δειγμάτων μπορούν να χαρακτηρίσουν τον οίνο ως 'εξελιγμένο' ή 'έτοιμο οίνο', γεγονός που δηλώνει ότι δεν χρειάζεται να μείνουν άλλο στο βαρέλι, διότι αυτό πιθανόν να οδηγήσει σε περαιτέρω πολυμερισμό και καθίζηση ταννινών ή σύμπλοκων ανθοκυανών-ταννινών. Η συσχέτιση του δείκτη HCl σε σχέση με την ένταση χρώματος και τη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών σε συνάρτηση με την παρουσία οξυγόνου αναφέρθηκε παραπάνω.

6.8 Ταννίνες με τη μέθοδο BSA (δέσμευση από πρωτεΐνες – δείκτης στυπτικότητας)



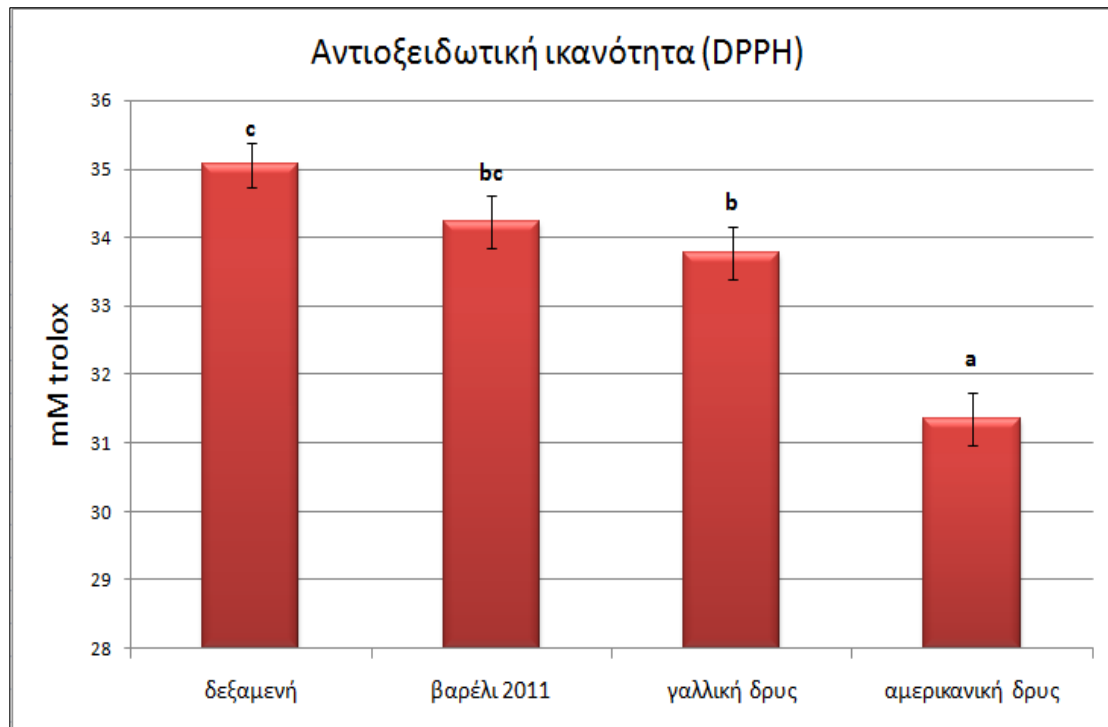
Εικόνα 30. Συγκέντρωση ταννινών οίνων (mg κατεχίνης /L) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Το περιεχόμενο των ταννινών (mg κατεχίνης/L οίνου) μετρήθηκε επίσης μετά την καταβύθιση με αλβουμίνη βόειου ορού (BSA). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου σχετίζονται έντονα με τη στυφή αίσθηση στο στόμα και γι' αυτό η ανάλυση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χημική εκτίμηση της στυπτικότητας ενός οίνου.

Η εικόνα 30 δείχνει το περιεχόμενο των ταννινών, οι οποίες έχουν την ικανότητα να ενώνονται με πρωτεΐνες και εκφράζει τη χημική στυπτικότητα των δειγμάτων. Τα δείγματα του παλαιού βαρελιού (329) και της γαλλικής δρυός (329) παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές στυπτικότητας με σημαντική διαφορά από τα άλλα δύο δείγματα. Την μικρότερη τιμή εμφάνισε το δείγμα της δεξαμενής (263) με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα. Η αμερικανική δρυς (282) είχε σημαντική διαφορά από τα άλλα δείγματα και τη δεύτερη μικρότερη τιμή.

Η υψηλή στυπτικότητα των δειγμάτων που περιελάμβαναν την επαφή του οίνου με ξύλο σε σχέση με το δείγμα της δεξαμενής μπορεί να οφείλεται στην εκχύλιση των ταννινών του ξύλου που πιθανόν αύξησε την στυπτικότητα.

6.9 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – μέθοδος DPPH

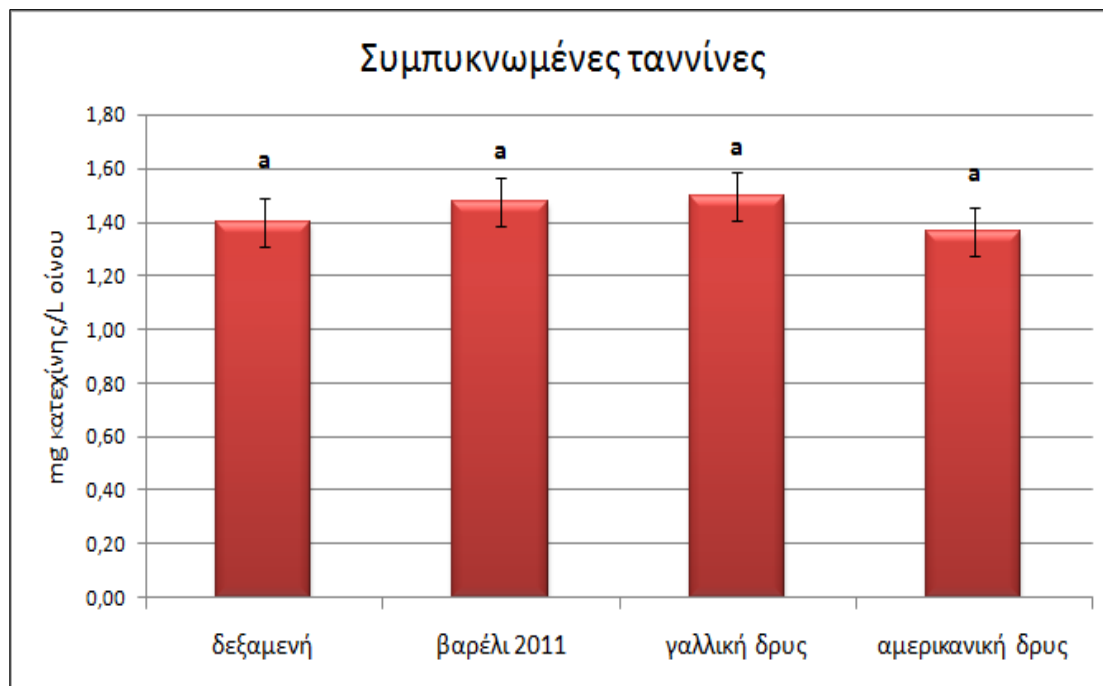


Εικόνα 31. Αντιοξειδωτική ικανότητα οίνων (mM Trolox) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Ως αντιοξειδωτική ικανότητα χαρακτηρίζεται η ικανότητα κάποιας ένωσης να αναστέλλει ή να εμποδίζει την οξειδωτική υποβάθμιση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι ενώσεις αυτές είναι τα φαινολικά συστατικά του οίνου. Για την εκτίμησή της χρησιμοποιήθηκε μία μέθοδος, η οποία στηρίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ουσιών να δεσμεύουν μία σταθερή, ελεύθερη, οργανική ρίζα αζώτου, το 1,1 διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζύλιο (DPPH).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων παρουσιάζεται στην εικόνα 31 και όπως φαίνεται η υψηλότερη τιμή εμφανίζεται στο δείγμα της δεξαμενής (35.06 mM trolox) με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα, εκτός του παλαιού βαρελιού που ακολουθεί με τιμή 34,23. Τη μικρότερη τιμή παρουσίασε η αμερικανική δρυς (31,35 mM trolox) με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα. Οι τιμές της γαλλικής δρυός κυμάνθηκαν στα 33,78 mM trolox χωρίς να έχει σημαντική διαφορά από το δείγμα του παλαιού βαρελιού. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το ξύλο επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα σε κάποιο βαθμό καθώς τα δείγματα του βαρελιού είχαν μικρότερες τιμές σε σχέση με τον μάρτυρα (δεξαμενή) πιθανώς λόγω της οξείδωσης που προκάλεσε η παρουσία οξυγόνου.

6.10 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose σε οίνους

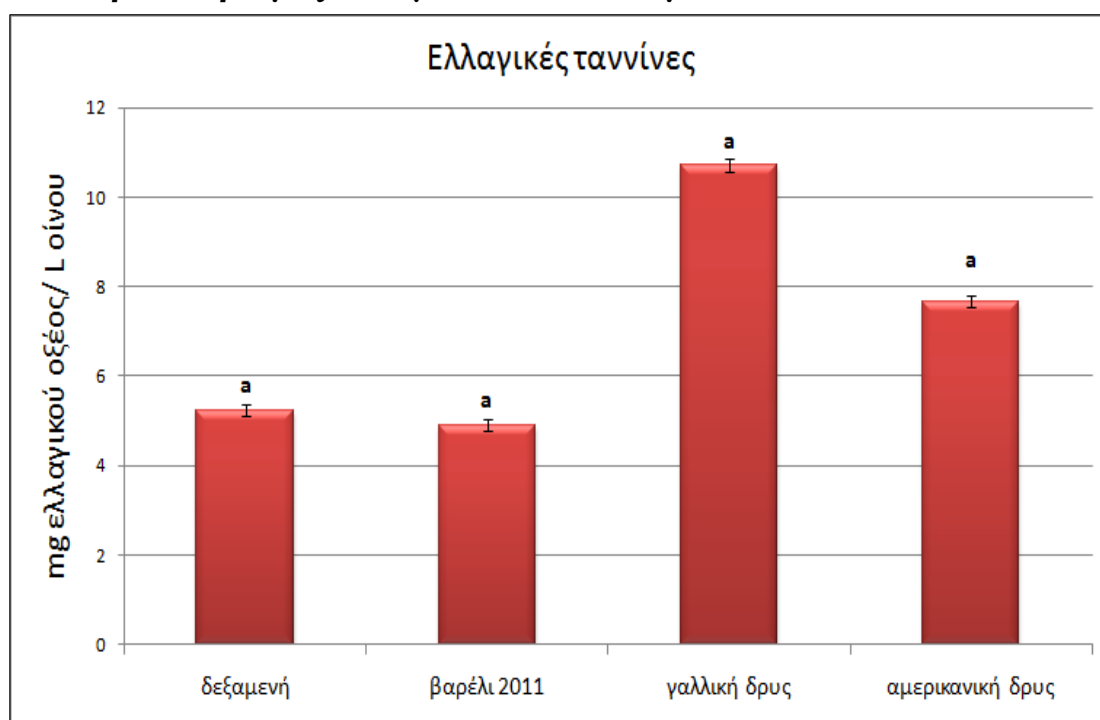


Εικόνα 32. Συμπυκνωμένες ταννίνες με methyl cellulose (mg κατεχίνης/L οίνου) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 32 απεικονίζεται η συγκέντρωση συμπυκνωμένων ταννινών ύστερα από καταβύθιση με methyl cellulose εκφρασμένες σε mg κατεχίνης/L οίνου για τα τέσσερα εξεταζόμενα δείγματα. Οι τιμές των δειγμάτων δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Την υψηλότερη τιμή εμφάνισε το δείγμα της γαλλικής δρυός (1,49) με το παλιό βαρέλι να ακολουθεί με 1,48 και την μικρότερη η αμερικανική δρυς με 1,37.

Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι φυσικές ταννίνες της σταφυλής και απαντώνται σε όλα τα στερεά μέρη αυτών (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Οι ταννίνες του σταφυλιού διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον βαθμό πολυμερισμού. Στους οίνους οι μονομοριακές προκυανιδίνες οξειδώνονται και με συνένωση μερικών μορίων τους δίνουν ταννίνες μικρού μοριακού βάρους (1.000-2.000) με κίτρινο χρώμα και πολύ στυφή γεύση. Πρόκειται για το 1-5% των συμπυκνωμένων φαινολικών παραγώγων των οίνων, συνεπώς η συμβολή τους στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων είναι ελάχιστη. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούν το σώμα του οίνου. Αντιπροσωπεύουν το 30-60% των ολικών φαινολικών παραγώγων και το ποσοστό τους αυξάνεται με την ηλικία του οίνου (Κουράκου, 1998).

6.11 Προσδιορισμός ελλαγιικών ταννινών με HPLC

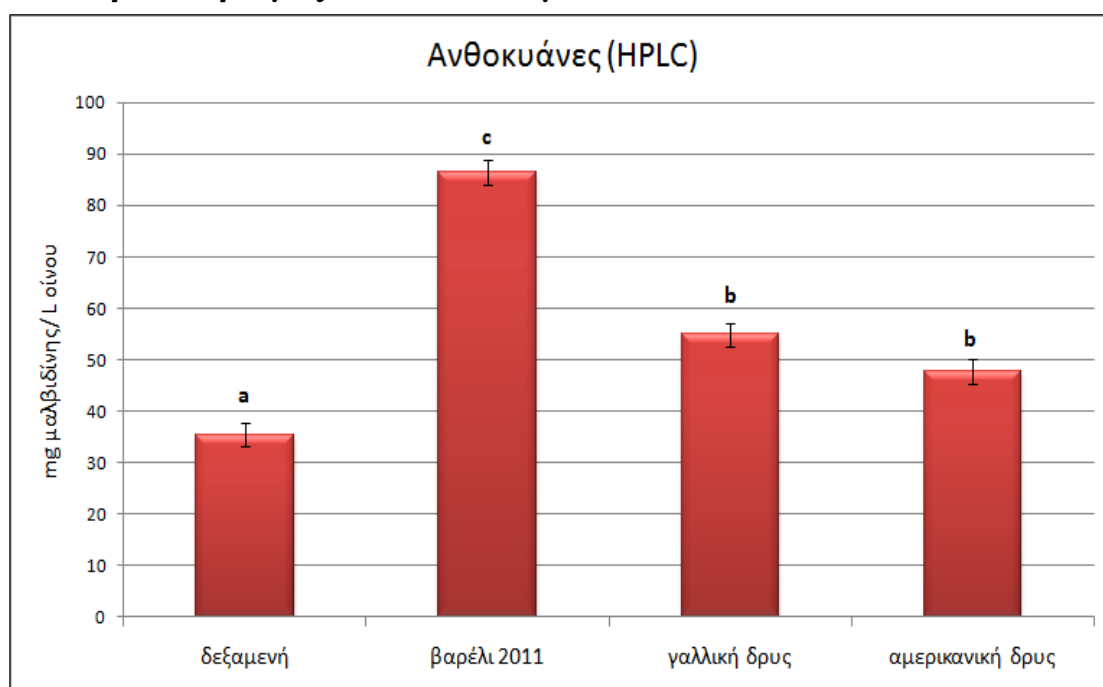


Εικόνα 33. Συγκέντρωση ελλαγιικών ταννινών οίνων (mg ελλαγιικού οξέος/L οίνου) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b,c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p<0,05$).

Οι υδρολύομενες ταννίνες (ελλαγιικές ταννίνες) μπορούν να βρεθούν σε σημαντικά επίπεδα στο ξύλο, άρα να εκχυλιστούν από το βαρέλι και να συμμετάσχουν σε αλλαγές στον οίνο κατά τα διάφορα στάδια της οινοποίησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζουν τη στυπτικότητα και την πικρή γεύση ενός οίνου. Η συγκέντρωση των ελλαγιικών ταννινών προσδιορίστηκε σε όλα τα δείγματα με την ποσοτική ανάλυση του ελλαγιικού οξέος που απελευθερώθηκε κατά τη διάρκεια της όξινης υδρόλυσης.

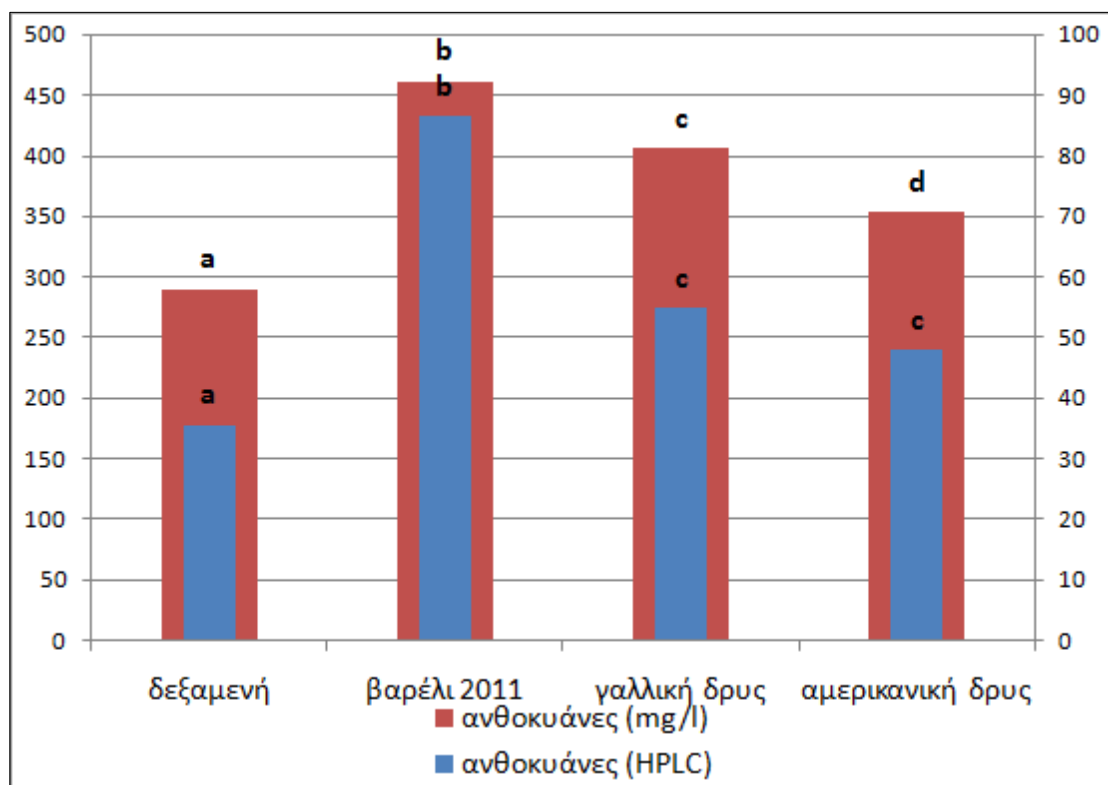
Στην εικόνα 33 φαίνονται οι τιμές συγκέντρωσης ελλαγιικών ταννινών, με τη γαλλική δρυς (10,70) να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθεί το δείγμα αμερικανικής δρυός (7,68) με σημαντική διαφορά από τα άλλα δείγματα. Τα δείγματα της δεξαμενής (5,24) και του παλαιού βαρελιού (4,91) είχαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις χωρίς να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Οι ελλαγιικές ταννίνες που ανιχνεύονται στο δείγμα της δεξαμενής, πιθανόν οφείλονται στη μετατροπή του γαλλικού οξέος σε ελλαγιικό, το οποίο παρατηρείται κατά την ωρίμανση του οίνου. Επίσης, οι χαμηλές τιμές του δείγματος παλαιού βαρελιού πιθανόν οφείλονται στο γεγονός ότι οι ελλαγιικές ταννίνες του ξύλου είχαν ήδη εκχυλιστεί στις προηγούμενες χρήσεις του βαρελιού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Zhang et al., 2015) η αμερικανική δρυς περιέχει λιγότερες ταννίνες από τα υπόλοιπα ξύλα δρυός, κάτι που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα περίπτωση, όπως φαίνεται και στην εικόνα 33. Ενώ οι ταννίνες αποτελούν το 1% περίπου της μάζας του ξύλου της αμερικανικής δρυός και το 8% της γαλλικής δρυός και διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην παλαίωση.

6.12 Προσδιορισμός ανθοκυανών με HPLC

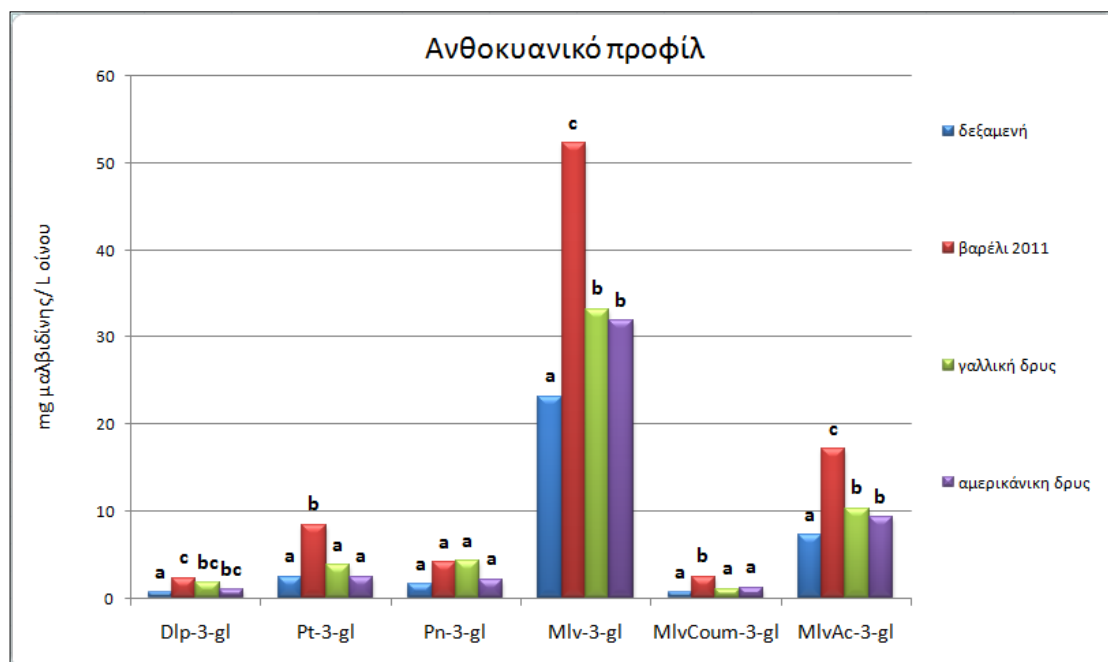


Εικόνα 34. Συγκεντρώσεις μονογλυκοζιτών-3 των ανθοκυανών των οίνων (mg μαλβιδίνης/L οίνου) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 34 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις μονογλυκοζιτών-3 των ανθοκυανών των οίνων εκφρασμένες σε mg μαλβιδίνης ανά λίτρο οίνου. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφάνισε το δείγμα παλαιού βαρελιού (86,50) με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα και ακολουθούν τα δείγματα γαλλικής (54,85) και αμερικανικής δρυς (47,74) τα οποία δεν είχαν στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Τη μικρότερη συγκέντρωση εμφάνισε το δείγμα της δεξαμενής (35,48) με σημαντική διαφορά από τα άλλα δείγματα. Οι συγκεντρώσεις μονογλυκοζιτών-3 των ανθοκυανών παρουσιάζουν αντίστοιχη μεταβολή με αυτή των ολικών ανθοκυανών οι οποίες αναφέρθηκαν προηγουμένως. Αυτή η αντιστοιχία γίνεται εμφανής στην Εικόνα 35, στην οποία γίνεται σύγκριση των δύο μετρήσεων. Από αυτό φαίνεται ότι και στις δύο μεθόδους τις υψηλότερες τιμές παρουσιάζει το δείγμα του παλαιού βαρελιού με σημαντική διαφορά, ακολουθεί το δείγμα της γαλλικής και της αμερικανικής δρυς και τη χαμηλότερη τιμή εμφάνισε η δεξαμενή.



Εικόνα 35. Αντιστοιχία συγκέντρωσης ολικών ανθοκυανών (mg ανθοκυανών/L οίνου) και μονογλυκοζιτών-3 των ανθοκυανών (mg μαλβιδίνης/L οίνου) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, d, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).



Εικόνα 36. Συγκεντρώσεις μονογλυκοζιτών-3 των ανθοκυανών των οίνων (mg/L) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

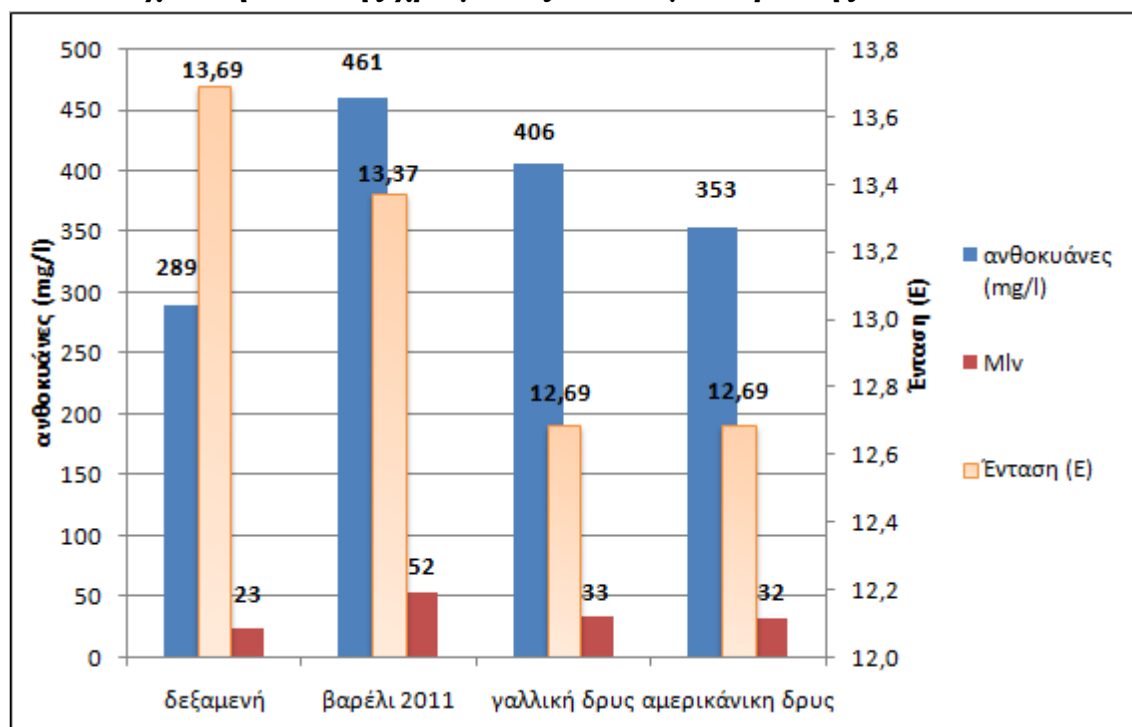
Η Εικόνα 36 δείχνει τις συγκεντρώσεις του ανθοκυανικού προφίλ για κάθε επέμβαση. Η συγκέντρωση της μαλβιδίνης είναι η μεγαλύτερη (Πίνακας 13) από σε σχέση με τις υπόλοιπες ανθοκυάνες και τους εστέρες τους, στα τέσσερα δείγματα. Την χαμηλότερη συγκέντρωση εμφάνισε η κυανιδίνη, η οποία ήταν σχεδόν μηδενική και για αυτό το λόγο δεν παρουσιάζεται στον Πίνακα 13. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 36 η παραμονή του οίνου σε γαλλική και αμερικανική δρυς είχε ως αποτέλεσμα τα συγκεκριμένα δείγματα να μην παρουσιάσουν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των ανθοκυανών. Τις υψηλότερες τιμές σε όλες τις ανθοκυάνες εμφάνισε το δείγμα του παλαιού βαρελιού με σημαντική διαφορά, εξαιρουμένης της παιονιδίνης που κανένα δείγμα δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά. Όσον αφορά τον γλυκοζίτη της μαλβιδίνης, η οποία είναι η κύρια ανθοκυάνη του οίνου, η συγκέντρωσή της στο παλαιό βαρέλι είναι πολύ υψηλότερη από όλα τα δείγματα και κυρίως από αυτό της δεξαμενής (υπερδιπλάσια διαφορά) όπως φαίνεται και στον πίνακα 8.

Πίνακας 13. Σύγκριση συγκέντρωσης ανθοκυανών (mg/L) μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων.

	Dlp-3-gl	Pt-3-gl	Pn-3-gl	Mlv-3-gl	MlvCoum-3-gl	MlvAc-3-gl
δεξαμενή	0,63a	2,44a	1,61a	23,17a	0,66a	7,23a
βαρέλι 2011	2,29c	8,40b	4,13a	52,29c	2,45b	17,11c
γαλλική δρυς	1,78bc	3,81a	4,28a	33,22b	1,07a	10,34b
αμερικανική δρυς	0,97bc	2,48a	2,15a	31,89b	1,22a	9,28b

Το γεγονός ότι το παλαιό βαρέλι εμφανίζει τόσο υψηλές τιμές μπορεί να ερμηνευθεί μέσω του πορώδους του ξύλου. Οι πόροι του ξύλου δεν είναι ανοιχτοί όπως στα καινούρια βαρέλια γαλλικής και αμερικανικής δρυός, και έτσι δεν είναι δυνατή η απορρόφηση των γλυκοζιτών των ανθοκυανών από αυτούς. Επίσης όπως φαίνεται και από την εικόνα 31, στο παλαιό βαρέλι η συγκέντρωση των ελλαγικών ταννινών είναι συγκριτικά μικρότερη και επομένως είναι πιθανόν αυτό να επηρεάζει την ικανότητα δημιουργίας συμπλόκων με τις μονομερείς ανθοκυάνες.

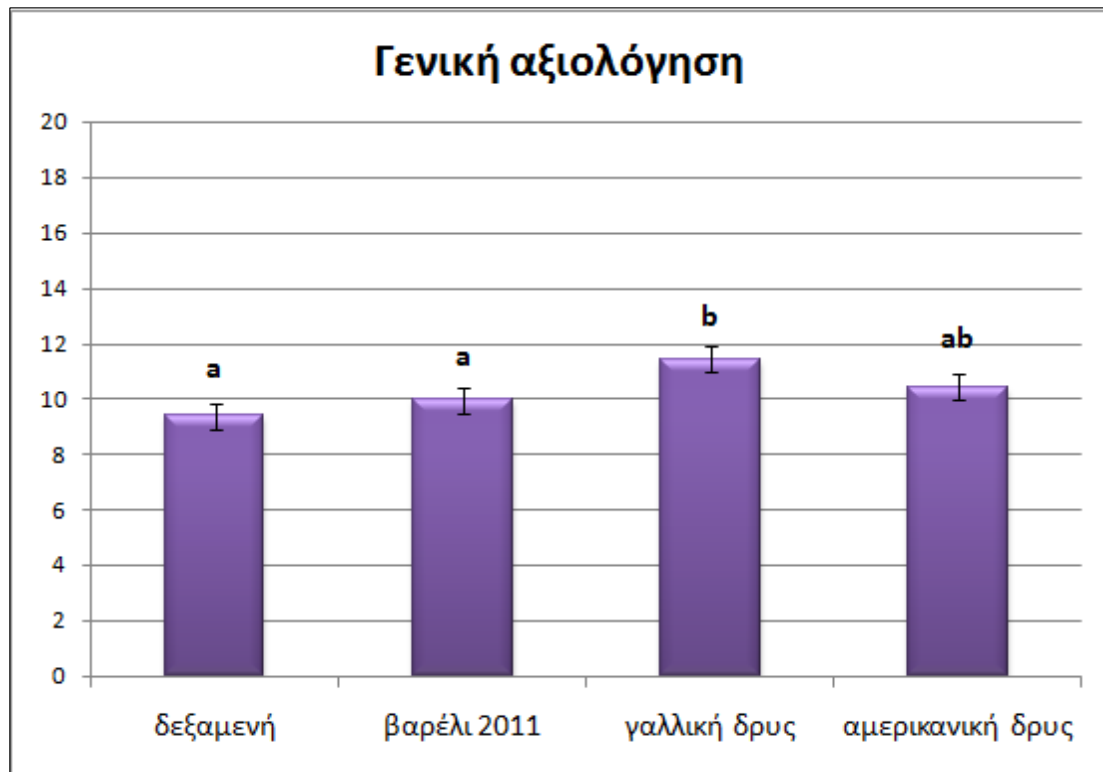
6.13 Συσχέτιση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης ανθοκυανών



Εικόνα 37. Σχέση ολικών ανθοκυανών, έντασης χρώματος και γλυκοζίτη της μαλβιδίνης.

Όπως φαίνεται στο εικόνα 37 η χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης ολικών ανθοκυανών ήταν 289 mg ανθοκυανών/L οίνου, γεγονός που δηλώνει καλή πολυφαινολική ωρίμαση και ικανοποιητική εκχύλιση ανθοκυανών. Τα δείγματα της γαλλικής και της αμερικανικής δρυός παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές τόσο στην ένταση χρώματος όσο και στις συγκεντρώσεις ανθοκυανών (HPLC). Το δείγμα του παλαιού βαρελιού παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή ολικών ανθοκυανών και ανθοκυανών μετρημένων με την μέθοδο HPLC ενώ και η ένταση χρώματος είναι υψηλή. Από αυτή τη συσχέτιση αποκλίνει το δείγμα της δεξαμενής καθώς παρουσιάζει την χαμηλότερη τιμή γλυκοζίτη της μαλβιδίνης τη χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών, αλλά και τη μεγαλύτερη ένταση χρώματος. Αυτό ίσως να μπορεί να εξηγηθεί από τη μέτρηση του δείκτη ιονισμού ανθοκυανών, στον οποίο παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή μαζί με την αμερικανική δρυς.

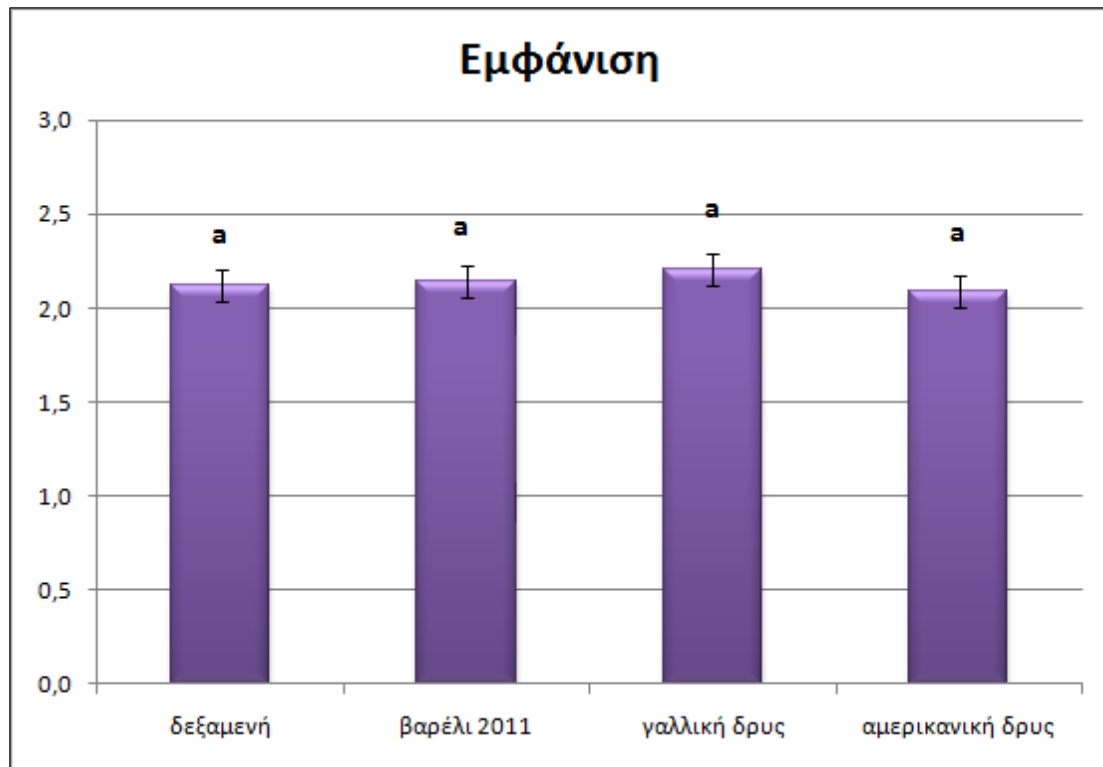
6.14 Οργανοληπτικός Έλεγχος



Εικόνα 38. Μέσος όρος βαθμολογίας οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην εικόνα 38 παρουσιάζεται το συνολικό άθροισμα της βαθμολογίας για το σύνολο των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων, από το σύνολο των δοκιμαστών. Η ανώτερη βαθμολογία που μπορούσε να πάρει ένα δείγμα όσον αφορά την γενική αξιολόγηση είναι 20.

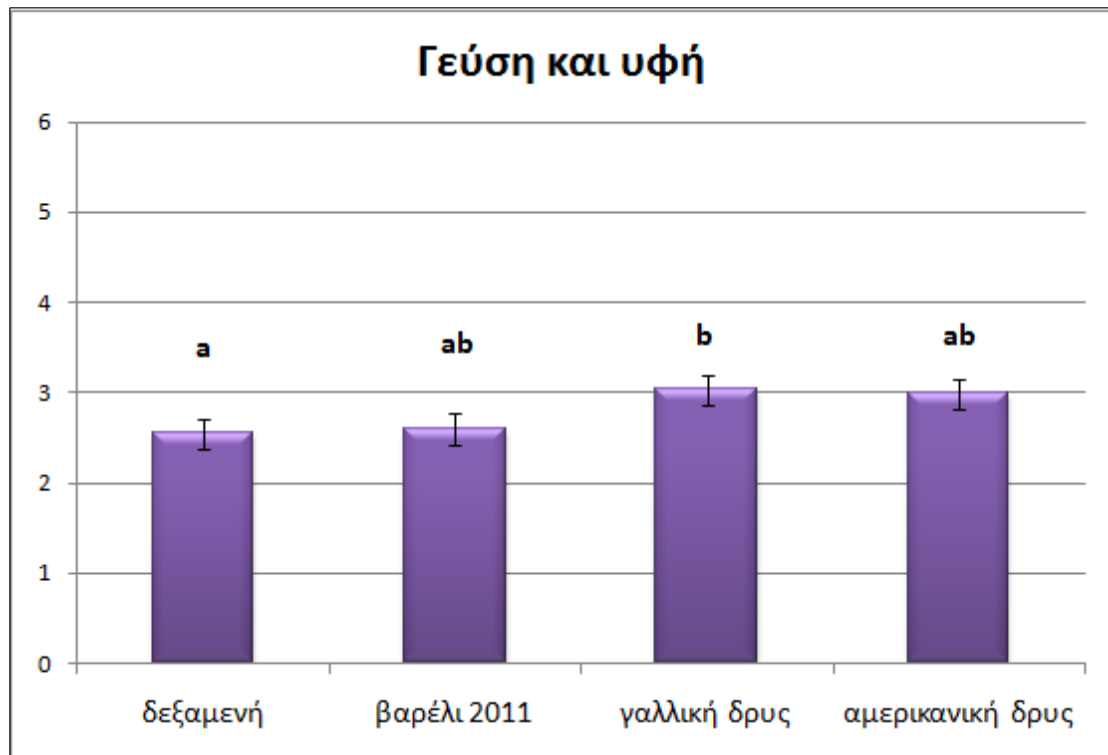
Όπως φαίνεται λοιπόν, οι οίνοι που παρέμειναν σε βαρέλι γαλλικής (11,44) και αμερικανικής (10,42) δρυός συγκέντρωσαν τις υψηλότερες βαθμολογίες χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Τις χαμηλότερες βαθμολογίες συγκέντρωσαν τα δείγματα δεξαμενής (9,38) και παλαιού βαρελιού (9,95) χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά τόσο μεταξύ τους όσο και με την αμερικανική δρυ. Η επίδραση του ξύλου δρυός γαλλικής προέλευσης φαίνεται ότι βελτίωσε σε σημαντικό βαθμό και εξέλιξε τον οίνο αποδεικνύοντας τη σημαντικότητα τόσο στην βελτίωση του προϊόντος όσο και στην αύξηση της εμπορικής του αξίας.



Εικόνα 39. Μέσος όρος βαθμολογίας της εμφάνισης των οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 39 παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας της εμφάνισης των οίνων, από το σύνολο των δοκιμαστών. Η ανώτερη βαθμολογία που μπορούσε να πάρει ένα δείγμα όσον αφορά την εμφάνιση είναι 3.

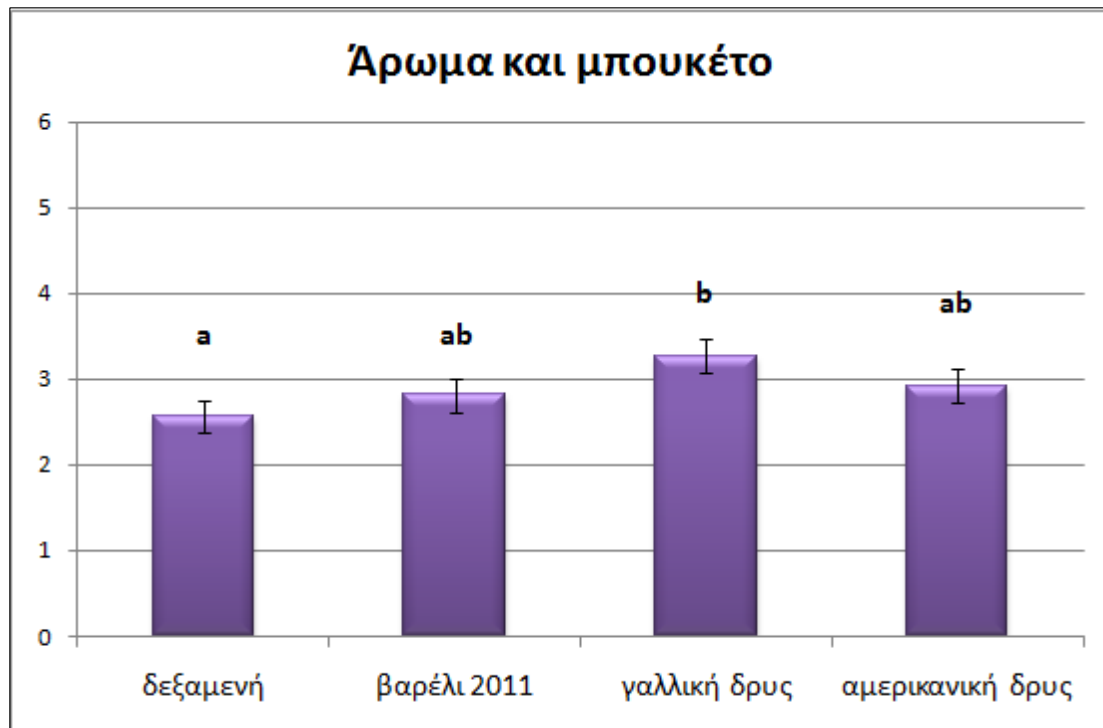
Όπως φαίνεται λοιπόν (Εικόνα 39), οι οίνοι που παρέμειναν σε βαρέλι γαλλικής (2,20) και αμερικανικής (2,09) δρυός συγκέντρωσαν τις υψηλότερες βαθμολογίες χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Τις χαμηλότερες βαθμολογίες συγκέντρωσαν τα δείγματα δεξαμενής (2,13) και παλαιού βαρελιού (2,14) χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά τόσο μεταξύ τους όσο και με την αμερικανική δρυ. Γενικά όσον αφορά την εμφάνιση κανένα δείγμα δεν παρουσίασε σημαντική υπεροχή για το σύνολο των δοκιμαστών.



Εικόνα 40. Μέσος όρος βαθμολογίας της γεύσης-υφής των οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 40 παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας της γεύσης και υφής των οίνων, από το σύνολο των δοκιμαστών. Η ανώτερη βαθμολογία που μπορούσε να πάρει ένα δείγμα όσον αφορά την εμφάνιση είναι 6.

Όπως φαίνεται λοιπόν, οι οίνοι που παρέμειναν σε βαρέλι γαλλικής (3,03) και αμερικανικής (2,98) δρυός συγκέντρωσαν τις υψηλότερες βαθμολογίες χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Τις χαμηλότερες βαθμολογίες συγκέντρωσαν τα δείγματα δεξαμενής (2,55) και παλαιού βαρελιού (2,59) χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά τόσο μεταξύ τους όσο και με την αμερικανική δρυ. Η γεύση και υφή του μάρτυρα εμφανίζει σημαντική βελτίωση μετά την παραμονή του οίνου σε βαρέλι γαλλικής δρυός για το σύνολο των δοκιμαστών.

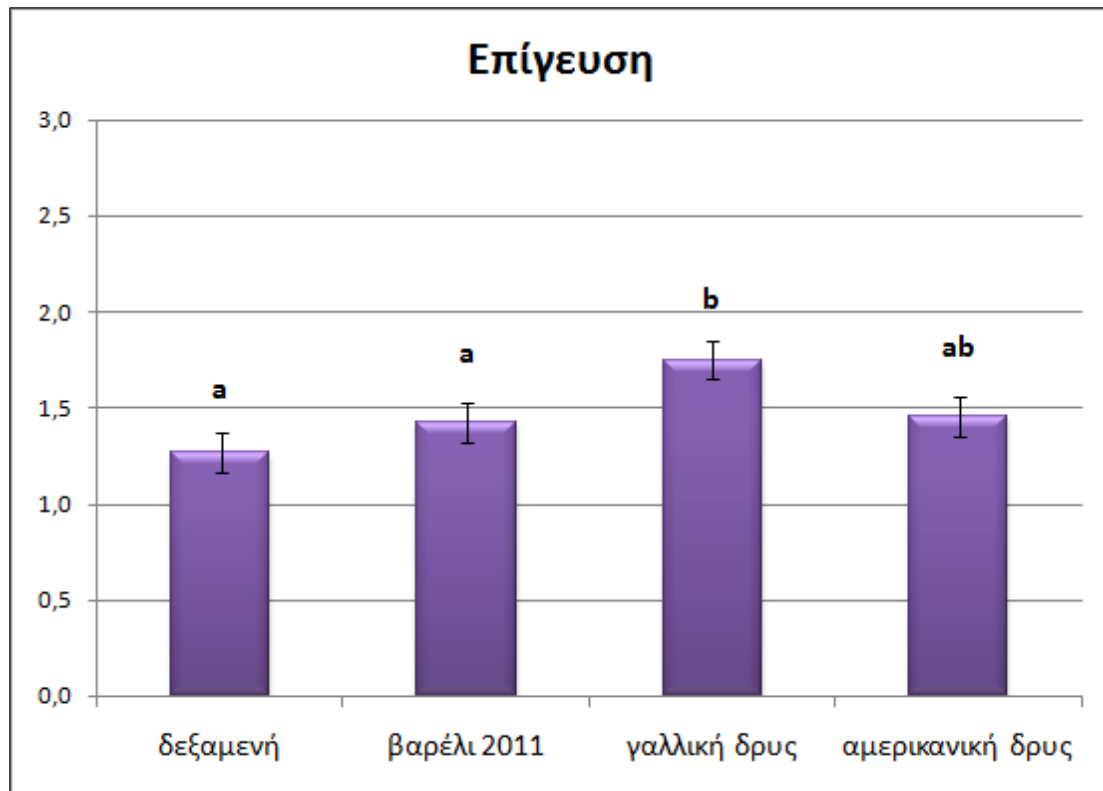


Εικόνα 41. Μέσος όρος βαθμολογίας του αρώματος-μπουκέτου των οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 41 παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας του αρώματος των οίνων, από το σύνολο των δοκιμαστών. Η ανώτερη βαθμολογία που μπορούσε να πάρει ένα δείγμα όσον αφορά την εμφάνιση είναι 6.

Όπως φαίνεται λοιπόν, οι οίνοι που πέρασαν από βαρέλι γαλλικής (3,27) και αμερικανικής (2,92) δρυς συγκέντρωσαν τις υψηλότερες βαθμολογίες χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Τις χαμηλότερες βαθμολογίες συγκέντρωσαν τα δείγματα δεξαμενής (2,58) και παλαιού βαρελιού (2,81) χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά τόσο μεταξύ τους όσο και με την αμερικανική δρυ.

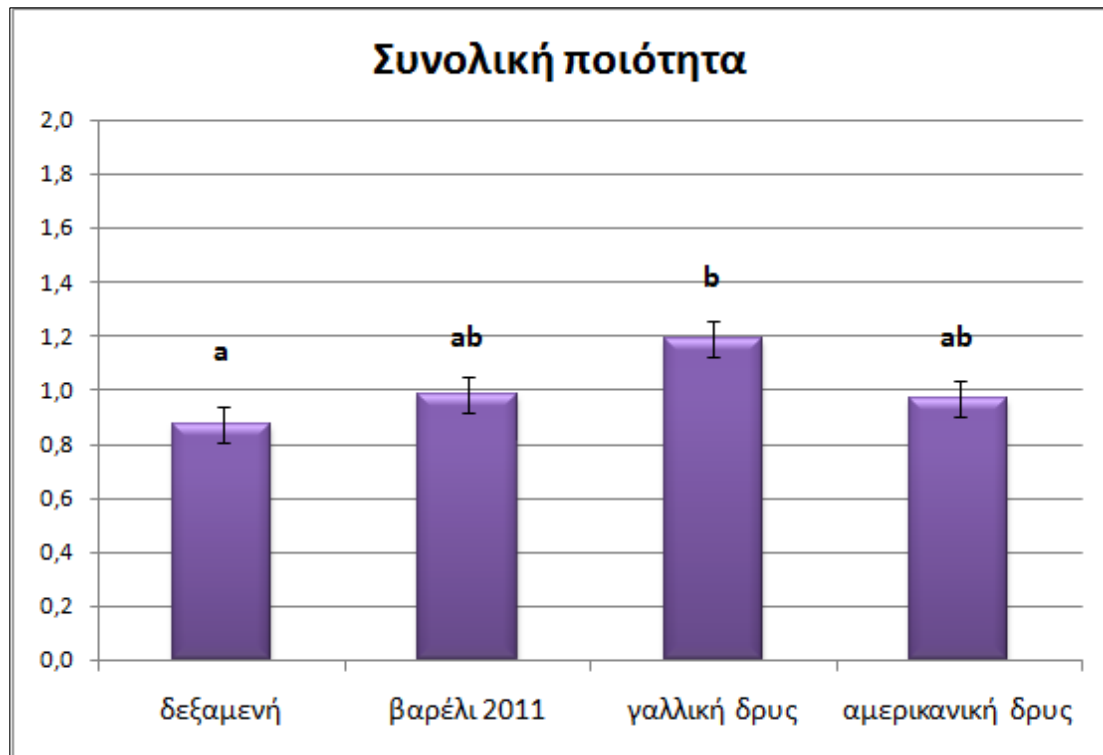
Η επίδραση του ξύλου στα αρωματικά συστατικά του οίνου φαίνεται ότι επηρέασε τη βαθμολογία των δοκιμαστών καθώς το δείγμα της δεξαμενής συγκέντρωσε τη χαμηλότερη βαθμολογία με σημαντική διαφορά από όλα τα δείγματα. Οι πτητικές ενώσεις που εκχυλίζονται από το ξύλο (βανιλίνη, ούισκι λακτόνη, φουρφουράλη, γουαϊκόλη κ.τ.λ.) φαίνεται να βελτίωσαν το άρωμα των οίνων.



Εικόνα 42. Μέσος όρος βαθμολογίας της επίγευσης των οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 42 παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας της επίγευσης των οίνων, από το σύνολο των δοκιμαστών. Η ανώτερη βαθμολογία που μπορούσε να πάρει ένα δείγμα όσον αφορά την εμφάνιση είναι 3.

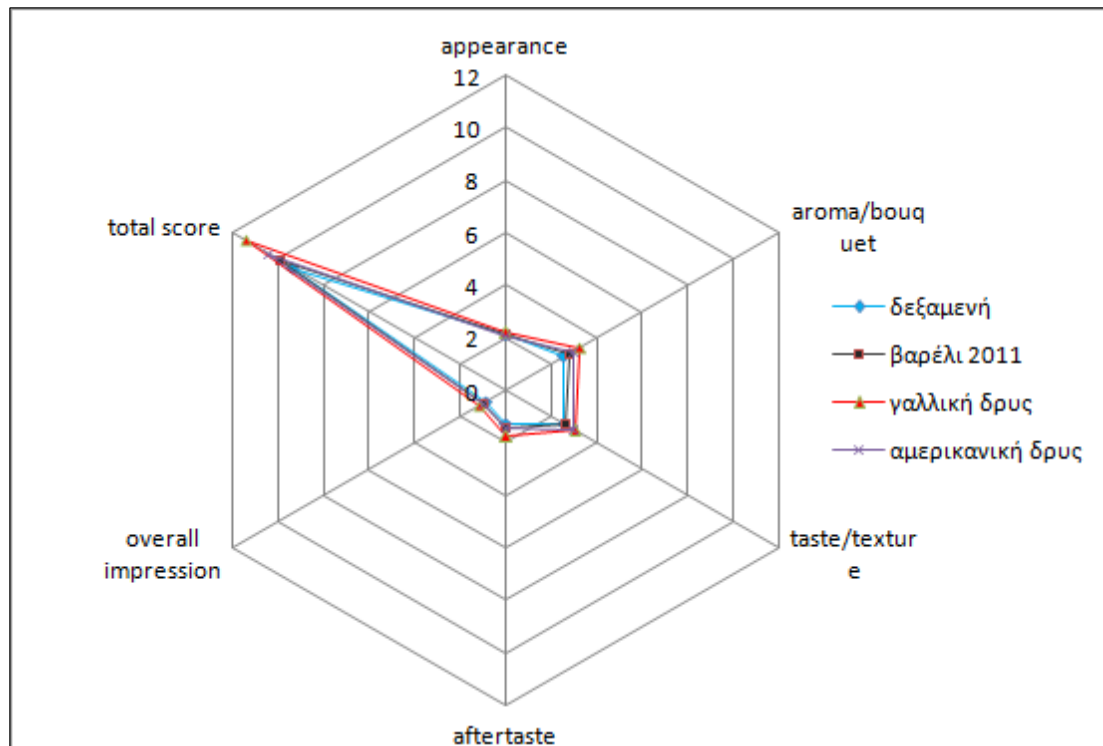
Όπως φαίνεται λοιπόν, οι οίνοι που παρέμειναν σε βαρέλι γαλλικής (1,75) και αμερικανικής (1,45) δρυς συγκέντρωσαν τις υψηλότερες βαθμολογίες χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Τις χαμηλότερες βαθμολογίες συγκέντρωσαν τα δείγματα δεξαμενής (1,27) και παλαιού βαρελιού (1,42) χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά τόσο μεταξύ τους όσο και με την αμερικανική δρυ.



Εικόνα 43. Μέσος όρος βαθμολογίας της γενικής εντύπωσης των οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 43 παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας της συνολικής ποιότητας των οίνων, από το σύνολο των δοκιμαστών. Η ανώτερη βαθμολογία που μπορούσε να πάρει ένα δείγμα όσον αφορά την εμφάνιση είναι 2.

Όπως φαίνεται λοιπόν, οι οίνοι που πέρασαν από βαρέλι γαλλικής (1,19) και αμερικανικής (0,97) δρυός συγκέντρωσαν τις υψηλότερες βαθμολογίες χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Τις χαμηλότερες βαθμολογίες συγκέντρωσαν τα δείγματα δεξαμενής (0,88) και παλαιού βαρελιού (0,98) χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά τόσο μεταξύ τους όσο και με την αμερικανική δρυ. Γενικά η υπεροχή της γαλλικής δρυός σε σχέση με το μάρτυρα είναι σημαντική, όπως ήταν και στις κατηγορίες του αρώματος, της γεύσης, της υφής και της επίγευσης επιδρώντας σε μεγάλο βαθμό στην εξέλιξη του οίνου.



Εικόνα 44. Μέσος όρος βαθμολογίας οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 44 παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας του συνόλου των χαρακτηριστικών των οίνων, από το σύνολο των δοκιμαστών. Όπως φαίνεται λοιπόν, το δείγμα γαλλικής δρυός υπερέχει σε όλα τα εξεταζόμενα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά έχοντας διαφορά από τις άλλες επεμβάσεις εκτός από την εμφάνιση που οι βαθμολογίες δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά. Αντίθετα οι τιμές του δείγματος της δεξαμενής παρουσίασαν τις χαμηλότερες βαθμολογίες. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η επαφή του οίνου με το ξύλο βελτιώνει τον χαρακτήρα του οίνου και πιο συγκεκριμένα η γαλλική δρυς εμφανίζει μια υπεροχή έναντι της αμερικανικής δρυός και του παλαιού βαρελιού σε όλες τις κατηγορίες που κλήθηκε να βαθμολογήσει το πάνελ των δοκιμαστών βελτιώνοντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου καθώς και την ποιότητα αυτού.

7 Συμπεράσματα

Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετήσουμε επιλεγμένες ποιοτικές παραμέτρους οίνων ποικιλίας Syrah μετά την παραμονή τους σε διαφορετικού τύπου βαρέλια. Συνολικά, παρατηρείται ότι οι οίνοι που παρέμειναν στο βαρέλι παρουσιάζουν και στις τέσσερις παραμέτρους που μελετήθηκαν (ένταση, απόχρωση, ολικές ανθοκυάνες, δείκτης ιονισμού) τις βέλτιστες τιμές. Πιο συγκεκριμένα, μεγάλη ένταση χρώματος και χαμηλή απόχρωση, υψηλή συγκέντρωση ανθοκυανών και υψηλό αριθμητικά δείκτη ιονισμού. Γενικότερα ο οίνος που παρέμεινε σε βαρέλι αμερικανικής δρυός παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές του δείκτη HCl, της συγκέντρωσης συμπυκνωμένων ταννινών, της αντιοξειδωτικής ικανότητας, του δείκτη ολικών φαινολών (Δ.Φ.Ο.) και της συγκέντρωσης ολικών ανθοκυανών σε σχέση με τα, υπόλοιπα δείγματα που παρέμειναν στο βαρέλι. Οι τιμές του δείκτη υδροχλωρικού οξέος είναι πολύ υψηλές και μεγαλύτερες του 25 % κάτι που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Ribereau-Gayon et al., 2006) δείχνει υψηλή συγκέντρωση πολυμερισμένων ταννινών. Οι υψηλές τιμές (ανω του 25 %) των δειγμάτων μπορούν να χαρακτηρίσουν τον οίνο ως 'εξελιγμένο' ή 'έτοιμο οίνο', γεγονός που υποδηλώνει ότι ίσως δεν χρειάζεται να παραμείνουν άλλο στο βαρέλι, διότι αυτό πιθανόν να οδηγήσει σε περαιτέρω πολυμερισμό και καθίζηση ταννινών ή σύμπλοκων ανθοκυανών-ταννινών.

Το δείγμα που παρέμεινε στο παλαιό βαρέλι παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή έγχρωμων και ολικών ανθοκυανών, ενώ παράλληλα και η ένταση χρώματος είναι υψηλή. Σε αντίθεση, το δείγμα που παρέμεινε στην δεξαμενή παρουσιάζει την χαμηλότερη τιμή επιμέρους ανθοκυανών (μετρημένων με HPLC), τη χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών, αλλά τη μεγαλύτερη ένταση χρώματος. Αυτό ίσως να μπορεί να εξηγηθεί από την τιμή του δείκτη ιονισμού ανθοκυανών, η οποία είναι η μεγαλύτερη τιμή συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές των υπόλοιπων δειγμάτων. Η υψηλή τιμή του δείγματος της δεξαμενής δείχνει ότι το χρώμα οφείλεται κυρίως στις ανθοκυάνες, ενώ στα δείγματα που έχουν έρθει σε επαφή με το ξύλο του βαρελιού πιθανόν έχουν αρχίσει να εμπλέκονται και οι ταννίνες, ειδικά στα καινούρια βαρέλια γαλλικής και αμερικανικής δρυός, καθώς στο παλαιό βαρέλι ποσότητα αυτών έχει εκχυλιστεί μειώνοντας έτσι την επίδραση τους στην ένταση του χρώματος. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι τιμές του δείκτη ιονισμού είναι αρκετά υψηλές για νέους οίνους (2013), γεγονός που οφείλεται στην σταθεροποίηση του χρώματος λόγω των σχηματιζόμενων συμπλόκων των ταννινών με κατιόντα φλαβυλίου. Οι χαμηλές τιμές των ολικών ανθοκυανών σε συνδυασμό με την υψηλή ένταση χρώματος και τον δείκτη HCl, μαρτυρούν την έκθεση του δείγματος της δεξαμενής σε οξυγόνο σε μεγαλύτερο βαθμό από τη μικροοξυγόνωση που υπόκεινται τα δείγματα των βαρελιών. Σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξαν οι Moutounet et al., (1996) και οι Ribereau-Gayon et al., (1983) σε σχετική τους έρευνα. Η μείωση της συγκέντρωσης ανθοκυανών οφείλεται σε αντιδράσεις αποικοδόμησης και σταθεροποίησης, καθώς και σε αλλαγές στη δομή τους. Το συμπέρασμα είναι ότι η παρουσία οξυγόνου αυξάνει την ένταση χρώματος, μειώνει συνήθως τη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών και παρουσιάζει υψηλότερες τιμές δείκτη HCl. Σχετικά με την συγκέντρωση των ελλαγιικών ταννινών τα δείγματα των βαρελιών παρουσίασαν υψηλότερες τιμές από το μάρτυρα. Οι ελλαγιικές ταννίνες που ανιχνεύονται στο δείγμα της δεξαμενής, πιθανόν οφείλονται στη μετατροπή του γαλλικού οξέος σε ελλαγιικό, το οποίο παρατηρείται κατά την ωρίμαση του οίνου. Επίσης, οι χαμηλές τιμές του δείγματος παλαιού βαρελιού πιθανόν οφείλονται στο γεγονός ότι οι ελλαγιικές ταννίνες του ξύλου είχαν ήδη εκχυλιστεί στις προηγούμενες

χρήσεις του βαρελιού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Zhang et al., 2015) η αμερικανική δρυς περιέχει λιγότερες ταννίνες από τα υπόλοιπα ξύλα δρυός, κάτι που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα περίπτωση. Όσον αφορά τη συγκέντρωση ολικών φαινολικών, το δείγμα της δεξαμενής παρουσίασε την υψηλότερη τιμή με σημαντική στατιστικά διαφορά από τα δείγματα των υπόλοιπων βαρελιών. Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται στην επίδραση του βαρελιού οδηγώντας σε περαιτέρω πολυμερισμό και καθίζηση ταννινών ή σύμπλοκων ανθοκυανών-ταννινών. Επίσης τα δείγματα που παρέμειναν στα βαρελια παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές στο δείκτη στυπτικότητας. Η υψηλές τιμές της χημικής στυπτικότητας που παρατηρήθηκε στα δειγμάτα οίνου που ήταν σε επαφή με το ξύλο του βαρελιού σε σχέση με το δείγμα της δεξαμενής μπορεί να οφείλονται στην εκχύλιση των ελλαγικών ταννινών που πιθανόν αύξησε την στυπτικότητα.

Όσον αφορά τον οργανοληπτικό έλεγχο το πάνελ των δοκιμαστών έδειξε να προτιμά τον οίνο που παρέμεινε σε βαρέλι γαλλικής δρυός, καθώς υπερείχε στην εμφάνιση, το άρωμα, την γεύση και την επίγευση συγκρινόμενος με τα υπόλοιπα δείγματα. Επίσης φαίνεται να υπερέχουν οι οίνοι των βαρελιών σε σχέση με τον μάρτυρα (δεξαμενή) δείχνοντας την θετική επίδραση του ξύλου στα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες του οίνου. Γενικά επιβεβαιώνεται η θετική επίδραση του ξύλου στην εξέλιξη του οίνου, καθώς και στη βελτίωση του όσον αφορά την εμφάνιση, τη γεύση, την υφή και την επίγευση. Οι χημικές αλλαγές που υφίσταται ο οίνος κατά την οξειδωτική ωρίμαση έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές κυρίως στις διαδεδομένες ερυθρές ποικιλίες, αλλά είναι σημαντικό να συνεχιστεί ούτως ώστε να μελετηθεί το δυναμικό τόσο ίδιων ποικιλιών σε διαφορετικά terroir, όσο και κλώνων αυτών που μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά. Επίσης υπάρχουν ανεξερευνήτες ερυθρές ποικιλίες που οι δυνατότητες οξειδωτικής ωρίμασης τους δεν έχουν μελετηθεί ακόμα.

Βιβλιογραφία

- Adams, D.O., 2006: Phenolics and ripening in grape berries. ASEV 2005 Phenolics Symposium. American Journal of Enology and Viticulture 57: 3: 249-256.**
- Alvarez I., Aleixandre J.L., Garcia M.J., Lizama V. (2005). Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politecnica de Valencia, Spain. 109-114.**
- Asano K., Shinagawa K. and Hashimoto N. (1982) am. Soc., Brew. Chem., 40 (4), 147.**
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V. and Moutounet M. (2002), Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making, Analytica Chimica Acta, 458, 15–27.**
- Bakker , J., Bridle, P., Honda, T., Kuxvano, H., Saito, N., Terahara, N. and Timberlake, C.F. (1996), Identification of an anthocyanin occurring in some red wines, Phytochemistry, 44, 1375-1382.**
- Bao Do, C., Cormier, F. and Nicolas, Y. (1995), Isolation and characterization of a UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucosyltransferase from grape cell suspension cultures (Vitis vinifera L.), Plant Science, 112, 43-51. Beckman, C.H., 2000.**
- Bate-Smith E.C. (1973) Phytochemistry, 12, 907.**
- Beckman, C.H. (2000), Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants?, Physiological and Molecular Plant Pathology, 57, 101-110.**
- Blasco, A. J., Rogerio, M. C., González, M. C., & Escarpa, A. (2005). “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. Analytica Chimica Acta, 539, 237–244.**
- Boss, P.K. και Davies, C., 2001: Molecular biology of sugar and anthocyanin accumulation in grape berries. In: Roubelakis-Angelakis K.A (Eds) Molecular Biology & Technology of the Grapevine, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-33.**
- Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.R., 1996: Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry color skin color. Australian Journal of Grape and Wine Research 2: 163-170.**
- Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.R., 1996: Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing Vitis vinifera L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. Plant Physiology 111: 1059-1066.**
- Boulton, R. (2001), The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review, American Journal of Enology and Viticulture, 52, 67-87.**
- Bourzeix, M., et al. 1986. A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by products of the vine. Bull. l'O.I.V. 59: 1171–1254.**
- Brouillard, R., Chssaing, S. and Fougerousse, A. (2003), Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is that red wine color lasts so long?, Phytochemistry, 64, 1179-1186.**

- Brouillard, R. and Dangles, (1994), In *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Edited by Harborne, J.B. pp. 565-588.
- Castaneda-Ovado, A., Pacheco-Hernandez, M., Paez-Hernandez, M., Rodriguez, J. and Galan-Vidal, C. (2009), Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Galassi, S. and Amati, A. (2000), Level of single bioactive phenolics in red wine as a function of the oxygen supplied during storage, *Food Chemistry*, 69, 61-67.
- Castellarin, S.D., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E. και Di Gaspero, G., 2007: Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell and Environment* 30: 1381-1399.
- Chapon L. (1993), *J. Inst. Brew.*, 99, 49.
- Chen J., Wen, P., Cheng Zhan J., Li, J., Wan., S. and Huang, D. (2006), Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries, *Postharvest Biology and Technology*, 40, 64-72.
- Chen J., Wen, P., Kong, W., Pan, Q., Wan, S. and Huang, W. (2006), Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenyl propanoid metabolism during grape berry development, *Journal of plant physiology*, 163, 115-127.
- Chira K., Teissedre P.L., Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected to different toasting methods: Behaviour during storage: *Food Chemistry* 140 (2013), 168-177.
- Coupois-Paul I. (1993) Thèse de Doctorat en Biotechnologies et Industries Alimentaires, INPL, Nancy, France.
- Darias-Martin, J., Carillo, M., Diaz, E. and Boulton, R.B. (2001) Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments, *Food Chemistry*, 73, 217-220.
- De Beer, D., Habertson, J.F., Kilmartin, P.A., Roginsky, V., Barsukova, T., Adams, D.O. και Waterhouse, A.L., 2004: Phenolics: A comparison of diverse analytical methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 55:4: 389-400.
- Del Alamo Sanza, M., Domínguez, I N., Cárcel Cárcel, L.M. & Gracia, L.N., 2004. Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Anal. Chim. Acta* 513, 229-237.
- Dell'Agli, M., Busciala, A., and Bosisio, E. (2004), Vascular effects of wine polyphenols, *Cardiovascular Research*, 63, 593-602.
- De Freitas V. (1995) Thèse de Doctorat OEnologie-Ampelologie, Universite de Bordeaux II.
- Dubourdieu F. (1992) *Les Grands Bordeaux de 1945 a 1988*. Mollat, Bordeaux.
- Downey, O.M., Dokoozlian, N.K. και Krstic, M.P., 2006: Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. ASEV 2005 Phenolics Symposium. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 3: 257-268.

- Downey, O.M., Harvey, J.S. and Robinson, S.P., 2004: The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10: 55-73.
- Echeverry, C., Ferreira, M., Reyes-Parada, M., Abin-Carriquiry, J.A., Blasina, F., Gonzalez-Neves, G. and Dajas, F. (2005), Changes in antioxidant capacity of Tannant red wines during early maturation, *Journal of Food Engineering*, 69, 147-154.
- Eiro, M. and Heinonen, M. (2002), Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation, *Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7461-7466.
- Escarpa A. and González M.C. (2001), "Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods", *Analytica Chimica Acta*, 427, 119 – 127.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the FolinCiocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8139–8144.
- Flanzy M. and Poux C. (1958) *Ann. Tech. Agric.*, 7, 377.
- Galvin C. (1993) *These de Doctorat OEnologie-Ampélogie, Université de Bordeaux II.*
- García-Falcón MS, Pérez-Lamella C, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J. Determination of phenolic compounds in wines: influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chem.* 2007;105:248–259. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.006.
- Glories Y. (1974). *Conn. vigne vin*, 8, 57 and 3, 75.
- Glories Y. (1978a). *Recherches sur la matière colorante des vins rouges. These de doctorat sciences, université de Bordeaux II.*
- Glories Y. (1983) *Bull. de Liaison Groupe Polyphenols*, 11, 577.
- Glories Y. and Augustin M. (1994) *In INRA-Viti, Bordeaux*, 37.
- Glories Y. (1978a) *Recherches sur la matière colorante des vins rouges. These de Doctorat Sciences, Université de Bordeaux II.*
- Glories Y. (1987) *Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie.* (ed. G. Gimberteau). *Special Conn. Vigne Vin*, 81.
- Gomez-Plaza, E., Minano, A. and Lopez-Roca, J. M. (2006), Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods, *Food Chemistry*, 97, 87-94.
- Gonzalez-Manzano, M., Rivas-Gonzalo, J. and Santos-Buelga, C. (2004), Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration, *Analytica Chimica Acta*, 513, 283-289.
- Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., Rivas-Gonzalo, J., Escribano-Bailon, M.T. and Santos-Buelga, C. (2009), Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine, *Food Chemistry*, 114, 649-656.
- Guerra C., Glories Y. (1996) *Actualités Oenologiques 1995, Vème Symposium International D'oenologie, Bordeaux. Tec et Doc, Lavoisier.*

- Guerra C. (1997) Recherches sur les interactions anthocyanes-flavanols: application à l'interprétation chimique de la couleur des vins rouges. These Doctorat, Université de Bordeaux II.
- Gurbuz, O., Gocmen, D., Dagdelen, F., Gursoy, M., Aydin, S., Sahin, I., Buyukuysal, L. and Mahmet Usta (2007), Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection, *Food Chemistry*, 100, 518-525.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 809–812.
- Hakansson, A., Pardon, K., Hayasaka, Y., de Sa, M. and Marcus Herderich (2003), Structures and colour properties of new red wine pigments, *Tetrahedron Letters*, 44, 4887-4891.
- Harbertson, J. F.; Picciotto, E. A.; Adams, D. O. Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *Am. J. Enol. Vitic.* 2003, 54 (4), 301–306.
- Harborne, JB., (1980), Plant phenolics. In: BELL EA, CHARLWOOD BV (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology*, volume 8 Secondary Plant Products, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. Pp:329-395.
- Haslam E. (1980) *Phytochemistry*, 25, 77.
- Haslam E. (1981) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 309. Heredia, F.J. et al., 1998
- Heredia, F.J.; Francia-Aricha, E.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Vicario, I.M.; Santos-Buelga, C. 1998. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. PH effect. *Food Chemistry* 63: 491-498
- Hermosin-Gutierrez, I. Sanchez-Palomo L. E., Almudena Vicario Espinosa. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry* 92 (2005) 269–283.
- Ho, P., Hogg, T.A. and Silva, M.C.M. (1999), Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines, *Food Chemistry*, 64, 1999.
- Huisman, A., van de Wiel, A., Rabelink, T.J. and van Faasen, E. (2004), Wine polyphenols and ethanol do not significantly scavenge superoxide nor affect endothelial nitric oxide production, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 426-432.
- Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Carrasco-Pancorbo, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Application and potential of capillary electrophoresis methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 1130–1160.
- Jackson, R.S. (2008), *Wine Science, Principles and Applications*, 3d Edition, Academic Press, San Diego, California.
- Jackson, D.I. and Lombard, P.B. 1993: Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 44: 409-430.

- Kalili, K. M., & de Villiers, A. (2011). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of Separation Science*, 34, 854–876.
- Kallithraka, S., Arvanitogiannis, I., Zagouli, A. and Kefalas, P (2001), The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines, *Food Chemistry*, 75, 355-363.
- Kallithraka, S., Arvanitogiannis, I.S., Kefalas, P., El-Zagouli, A., Soufleros, E. And Psarra, E. (2001), Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin, *Food Chemistry*, 73, 501-514.
- Kallithraka, S., Mohdaly, A., Makris, D. and Kefalas, P. (2005), Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 375- 386.
- Kallithraka, S., Salacha, M. and Tzourou, I. (2009), Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage, *Food Chemistry*, 113, 500-505.
- Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Tzourou, E. and Lanaridis, P. (2006), Principal phenolic compounds in Greek red wines, *Food Chemistry*, 99, 784-793.
- Katalanic, V., Milos, M., Modun, D., Music, I. and Boban, M. (2004), Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin, *Food Chemistry*, 86, 593-600.
- Khan N. (2000) Role du bouchon de liège sur le vieillissement des vins en bouteille. Etudes de l'apport du liège et des phénomènes oxydatifs. These de Doctorat, Onologie-Ampélogie, Université Victor Segalen Bordeaux 2.
- Kennedy, J.A., Saucier, C. και Glories, Y., 2006: Grape and wine phenolics: History and perspective. ASEV 2005 Phenolics Symposium. *American Journal of Enology and Viticulture* 57:3: 239-248.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A. και Waterhouse, A.L., 2002: Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture* 53:3: 268-274.
- Kondrashov, A., Sevcik, R., Benakova, H., Kostirova, M. and Stipek, S. (2009), The key role of grape variety for antioxidant capacity of red wines, *European Society for Clinical Nutrition and Metabolism*, 4, 41-46.
- Kosir, I., Lapornic, B., Andresek, S., Wondra, A., Vrhovsek, U. and Xadric, J. (2004), Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance, *Analytica Chimica Acta*, 513, 277-282.
- Kourakou-Dragona, S., Sotirpoulou, S., The qualitative potential of the Hellenic vineyard in white wine-grape varieties, *Hellenica Oenologica*, 1985, 4, 39-66.
- Laborde J. (1910), *Rev. Viticult.*, 206.
- Lea A.G.H. (1992) In *Plant Polyphenol* (ed. Hemingway).

- Luque de Castro, M. D., González-Rodríguez, J., & Pérez-Juan, P. (2005). Analytical methods in wineries: Is it time to change? *Food Reviews International*, 21, 231–265.
- Luque-Rodriguez, J. M., Luque de Castro, M. D. and Perez-Juan, P. 2007. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. *Bioresource Technology* 98 (14): 2705–2713.
- Makris, D., Kallithraka, S. and Kefalas, P. (2006), Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 396-404.(a)Mantell, C. et al., 2002,
- Matejicek, D., Mikes, O., Klejdus, B., Sterbova, D. and Kuban, V. (2005), Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines, *Food Chemistry*, 90, 791-800.
- Mateus, N., Oliveira, J., Pissara, J., Gonzalez Paramas, A.M., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, S., Silva, A.M.S. and de Freitas, V. (2006), A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wine, *Food Chemistry*, 97, 689-695.
- Mateus, N., Pinto, R., Ruao, P. and de Freitas, V. (2004), Influence of the addition of grape seed procyanidins to Port wines in the resulting reactivity with human salivary proteins, *Food Chemistry*, 84, 195-200.
- Mateus, N., Machado, J.M. και De Freitas, V., 2002: Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 1689- 1695.
- Mateus, N., Marques, S., Gonçalves, A., Machado, J.M. και De Freitas, V., 2001: Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro Valley during ripening: Influence of cultivation altitude. *American Journal of Enology and Viticulture* 52:2: 115-121.
- Minussi, R.C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilo, D., Pastore, G.M. and Duran, N. (2003), Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chemistry*, 82, 409-416. *Mirabel* 2000
- Monagas, M., Gomez-Cordoves, C. and Bartolome, B. (2006), Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle, *Food Chemistry*, 95, 405-412.
- Moutounet M., Rabier Ph., Puech J.L., Verette E. and Barillere J.M. (1989) *Sci. Aliments*, 9 (1), 35.
- Moutounet M., Ducourneau D., Chassin M. and Lemaire T. (1996) 5th International Symposium on d'Oenologie, Tec. et Doc., Lavoisier Paris, p. 411.
- Nagel C.W. and Glories Y. (1991) *Am. J. Enol. Viticult.*, 42, 364.
- Nikfardjam, M.S., Mark, L., Avar, P., Figler, M. and Ohmacht, R. (2006), Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region, *Food Chemistry*, 98, 453-462.
- Nunez, V., Monagas, M., Gomez-Cordoves, M.C. and Bartolome, B. (2004), *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile, *Postharvest Biology and Technology*, 31, 69-79.
- Nunez-Delicado, E., Serrano-Megias, M., Perez-Lopez, A.J. and Lopez-Nicolas, J.M. (2007), Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape, *Food Chemistry*, 100, 108-114.

- Orak, H.H. (2007), Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations, *Scientia Horticulturae*, 111, 235-241.
- Pecsok, R.L., Shields, L.D., Cairns, T. and McWilliam, I.G. (1980), Σύγχρονες Μέθοδοι στη Χημική Ανάλυση, 2η Έκδοση, Πνευματικός Γ.Α., Αθήνα.
- Pissara, J., Lourenco, S., Gonzalez-Paramas, A.M., Mateus, N., Santos-Buelga, C. and De Freitas, V. (2004), Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl flavanol pigments in model solutions, *Analytica Chimica Acta*, 513, 215-221.
- Pocock, K.F., Sefton M.A., Williams J.P. (1994). Taste threshold of phenolic extracts of French and American oakwood: the influence of oak phenols on wine flavor. *Am. j. enol. viticulture* 45: 429–434.
- Pontallier P. (1981) Recherches sur les conditions d' élevage des vins rouges. Role des phenomenes oxydatifs. These de Docteur Ingenieur, Universite de Bordeaux II.
- Pontallier P., Glories Y. and Ribereau-Gayon P. (1980) *C.R. Acad. Agric.*, 66, 989.
- Prier, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. (1994), Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds, *Phytochemistry*, 36, 781-784.
- Proestos, C., Bakogiannis, A., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Kanellaki, M. and Komaitis, M., 2005. High Performance Liquid Chromatography Analyses of Phenolic Substances in Greek. *Food Control*, 16: 319-323.
- Roussis, I.G. & Sergianitis, S., 2008. Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flav. Fragr. J.* 23, 35-39.
- Ribereau-Gayon J. (1931) These Doctorat `es Sciences Physiques, Bordeaux.
- Ribereau-Gayon J. (1933) *Bull. Soc. Chim.*, 53, 209.
- Ribéreau-Gayon P., Stonestreet E. (1965). Le dosage des anthocianes dans le vin rouge. *Bulletin de la société chimique de France*, v. 9, n. 419, p.2649-2652.
- Ribéreau-Gayon (1966), Ribereau-Grayon et al., 2006. *Handbook of enology Volume I, The microbiology of wine and vinification* 2nd edition. John Wiley and Sons Ltd.
- Ribereau-Grayon et al., 2006. *Handbook of enology Volume II, The chemistry of wine stabilization and treatments* 2nd edition. John Wiley and Sons Ltd.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2000). *Handbook of enology, Volume 1 & 2*. John Wiley & sons, LTD.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu D., Doneche, B. and Lonvaud, Al., 1998: *Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*. 84. Roby, G, Habertson, J.F., Adams, D.A. και Matthews, M.A., 2004: Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10: 100-107.
- Robinson J. (2003). *Jancis Robinson's Wine Course*. Third Edition. Abbeville Press.
- Robinson J. (2006). *The Oxford Companion to Wine*. Third Edition. Oxford University Press.

- Rodriguez-Delgado, M.A., Malovana, S., Perez, J.P., Borges, T. and Garcia Montelongo, F.J., 2001. Separation of Phenolic Compounds by High Performance Liquid Chromatography with Absorbance and Fluorimetric Detection. *Journal of Chromatography A*, 912: 249-257.
- Roussis, I., Lambropoulos, I., Tzimas, P., Gkouloti, A., Marinos, V., Tsoupeis, D. and Boutaris, I. (2008), Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 614-621.
- Sakkiadi, A.V., Staurakakis, M.N. and Hartounian, S.A. (2001), Direct HPLC assay of five biologically interesting phenolic antioxidants in varietal Greek red wines, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 34, 410-413.
- Salas, E., Atanasova, V., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Mazauric, J.P. and Cheynier, V. (2004), Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions, *Analytica Chimica Acta*, 513, 325-332.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., Cabanes, J. and Garcia-Carmona (1988), Characterization of catecholase and cresolase activities of monastrell grape polyphenol oxidase, *Phytochemistry*, 27, 319-321.
- Saucier C., Bourgeois G., Vitry C., Roux D. and Glories Y. (1997) *J. Agric. Food Chem.*
- Scieber, A., Stinzinger, F.C. and Carle, R. (2001), By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments, *Trends in Food Science & Technologie*, 12, 401-413. Smith and Markham, 1998.
- Simon C., Barathien K., Lagune M., Schmitter J.M., Fouquet E., Pianet I. and Dufranc E. (2003) *Actualites oenologiques 2003, VII`eme Symposium International d`oenologie, Bordeaux.*
- Smith, G.J., Markham, K.R. 1998. Tautomerism of flavonol glucosides - relevance to plant UV protection and flower colour. *Journal of Photochemistry and Photobiology A - Chemistry*, 118, 99-105.
- Somers, T. C. and Evans, M. E. (1977). Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "chemical age". *J. Sci. Food Agric.* 28, 279-287.
- Somers T. C., Ziemelis G. (1972). Interpretation of ultraviolet absorption in white wines. *J. sci. food agric.*, 23, 441-453.
- Stevenson T. (2005). *The Sotheby's Wine Encyclopedia*. Dorling Kindersley.
- Sudraud P. (1958) *Ann. Technol. Agric.*, 7, 203.
- Timberlake, C.F., and P. Bridle. 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 27:97-105
- Tsanova-Savova, S., Dimov, S. and Rabirova, F. (2002), Anthocyanins and colour variables of Bulgarian aged red wines, *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 647-654.
- Versari D., Daghini E., Virdis A., Ghiadoni L., Taddei S., Article first published online: 5 NOV 2008. *Experimental Physiology*, Volume 94, Issue 3, pages 317-321, March 2009.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V. and Waters, E. (2004), Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine, *Analytica Chimica Acta*, 513, 57-65.

- Vivas N., Glories Y. (1993b). System for seasoning of oakwood to cooperage. *Vitivinicultura*, 5-6, 47-50.
- Vivas N., Glories Y. (1996). Study and optimization of phenomena involved in natural seasoning of oakwood. *Rev. Fr. oenol.*, 158, 28-35.
- Vivas N., Glories Y., Lagune L., Saucier C. & Agustin M. (1994): Estimation of the polymerisation level of procyanidins from grapes and wines by use of p-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 28, 319-336
- Vivar-Quintana, A.M., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J.C. (2002), Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines, *Analytica Chimica Acta*, 458, 147-155.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I., Hendrickx, M.E. and Tobback, P.P. (1998), Activity, Electrophoretic Characteristics and Heat Inactivation of Polyphenoloxidases from Apples, Avocados, Grapes, Pears and Plums, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 31, 44-49.
- Waterhouse A. L., Wine Phenolics. Department of Viticulture and Enology, University of California, Davis, California 95616-8749, USA., 2002.
- Waterman P. G., Mole S., (1994), *Phytochemistry*, Volume 26, Issue 1, 23 December 1986, Pages 99-102.
- Zhang B., Cai J., Chang-Qing Duan, Malcolm J. Reeves and Fei He., A Review of Polyphenolics in Oak Woods: *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 6978-7014; doi:10.3390/ijms16046978.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Γεωργίου Θ., Η επίδραση της παλαίωσης στην ποιότητα των οίνων Έκδοση 11/2005
Λευκωσία – ΚΥΠΡΟΣ. Τομέας Δημοσιότητας- Κλάδου Γεωργικών Εφαρμογών και Δημοσιότητας
- Καράταγλης Σ., Φυσιολογία Φυτών Γ' Έκδοση. 1994. Εκδόσεις Art of Text.
- Κοτσερίδης Γ., 2006, Εργαστηριακές ασκήσεις οιολογίας II, Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης τροφίμων και διατροφής ανθρώπου, Αθήνα
- Κοτσερίδης Γ., 2005, Εργαστηριακές ασκήσεις οιολογίας I, Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης τροφίμων και διατροφής ανθρώπου, Αθήνα
- Κοτσερίδης, Γ. (2006), Σημειώσεις Οιολογίας II, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.
- Κουράκου-Δραγώνα, Σ. ,1998: Θέματα Οιολογίας, Εκδόσεις Τροχαλία.
- Μπασιούρας Σ., Παπαθανασοπούλου Α. (2010), Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης και φαινολικών ενώσεων σε λευκά κρασιά με τη μέθοδο ABTS, DPPH & FOLIN-CIOCALTEU. Πτυχιακή εργασία, Α. Τ.Ε.Ι. Θ Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων.
- Σουφλερός Ε. Ηρ., 2012. Οιολογία επιστήμη και τεχνολογία., Εκδόσεις ΔΙΤΟΜΟ.
- Σταυρακάκης Μ. Ν., 2010. Αμπελογραφία, Εκδόσεις Τροπή.

Συμεού Ε., (2011) Διδακτορική διατριβή. Μελέτη των φαινολικών συστατικών σταφυλιών και οίνου, Χίου και Νεμέας και της επίδρασης των ενζύμων και άλλων παραμέτρων σε αυτά.

Τσακίρης Α., 1998. Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί. Εκδ. Ψύχαλος.

Χαρβαλιά, Α. και Μπενά – Τζούρου, Ε. (1982), Τα φαινολικά συστατικά και το χρώμα των ελληνικών οίνων, Ελληνικά Οινολογικά Χρονικά, 2, 1-77, Ινστιτούτο Οίνου, Αθήνα.